



空军军医大学

Air Force Medical University

分类号 R681

U D C 617.3

密 级 公开

博士学位论文

多种来源骨骼干细胞在骨稳态与骨退行性变中的
相关作用研究

 高 博

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 临床医学

二级学科(专业) 外科学(骨外)

研 究 方 向 骨骼干细胞与骨退行性变

指 导 教 师 罗卓荆 教授(主任医师)

培 养 单 位 西京医院骨科

二〇一八年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解空军军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为空军军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为空军军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____导师签名：_____日期：_____

目 录

缩略语表	1
中文摘要	3
英文摘要	8
前 言	15
文献回顾	17
正 文	39
第一部分 骨外膜来源干细胞的鉴定及其在骨稳态与骨再生中的作用	39
1 材料	40
2 方法	41
3 结果	45
4 讨论	59
第二部分 骨髓间充质来源干细胞的异常分化、凋亡、自噬与衰老在骨稳态与骨退行性变中的作用	62
实验一 骨髓间充质来源干细胞的衰老在骨稳态与骨退行性变中的作用	63
1 材料	63
2 方法	64
3 结果	67
4 讨论	76
实验二 骨髓间充质来源干细胞的凋亡与自噬在骨稳态与骨退行性变中的作用	78
1 材料	78
2 方法	79
3 结果	82
4 讨论	91

实验三 骨髓间充质来源干细胞的成骨-成脂分化偶联在骨稳态与骨退行性变中的作用·····	94
1 材料·····	94
2 方法·····	95
3 结果·····	98
4 讨论·····	105
第三部分 肥大软骨细胞来源干细胞的鉴定及其在骨稳态与骨退行性变中的作用·····	107
1 材料·····	108
2 方法·····	109
3 结果·····	112
4 讨论·····	117
小 结·····	120
参考文献·····	122
个人简历和研究成果·····	138
致 谢·····	143

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
PDCs	Periosteum-derived stem cells	骨外膜来源干细胞
HC-MSCs	Hypertrophic chondrocyte-derived stem cells	肥大软骨细胞来源干细胞
SSCs	Skeletal stem cells	骨骼干细胞
MSCs	Mesenchymal stem cells	骨髓间充质干细胞
Col10	Collagen 10	X 型胶原蛋白
SCF	Stem Cell Factor	干细胞因子
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2	组蛋白-赖氨酸 N-甲转移酶
GPR120	G-protein receptor 120	G 蛋白偶联受体 120
EPA	Eicosapentaenoic Acid	二十碳五烯酸
TMP	Tetramethylpyrazine	四甲基吡嗪
AA	Arachidonic Acid	花生四烯酸
GIOP	Glucocorticoid-induced osteoporosis	糖皮质激素诱导性骨质疏松
IGF-1	Insulin-like Growth Factors	胰岛素生长因子
CL	Cambium Layer	骨外膜生发层
FL	Fibrous Layer	骨外膜纤维层
GC	Glucocorticoid	糖皮质激素
TGF- β	Transforming Growth Factor- β	转化生长因子 β
LSK	Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-kit ⁺	骨髓造血干细胞
Rb2	Ginsenoside-Rb2	人参皂苷 Rb2
FGF	Fibroblast growth factors	成纤维细胞生长因子
SnCs	Senescent cells	衰老细胞

缩略词	英文全称	中文全称
SASP	Senescence-associated secretory phenotype	衰老相关分泌表型
LepR	Leptin Receptor	瘦素受体
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule	血管粘附因子
IL-7	Interleukin7	白介素 7
PUFA	Poly-unsaturated Fatty Acid	多聚不饱和脂肪酸
BMA	Bone marrow Adipocyte	骨髓脂肪细胞

多种来源骨骼干细胞在骨稳态与骨退行性变中的 相关作用研究

博士研究生：高 博

导 师：罗卓荆 教 授

辅 导 教 师：杨 柳 副教授

空军军医大学西京医院骨科，西安 710032

资助基金项目：国家重点基础研究发展计划（2011CB964703）

国家自然科学基金（No. 81572192）

中文摘要

骨骼系统作为人体最重要的生命系统之一，负责为机体提供运动、支持与保护作用。随着近年来研究的深入，逐步发现骨组织为机体重要的内分泌器官，其内环境的稳态为多脏器生物代谢提供保障。骨骼系统内含有多种干细胞并伴随有丰富的神经与血管网络，其内包含的骨髓不仅在生命体早期提供重要的造血支持作用，并且在机体成熟后作为“种子细胞库”，对全身骨量的维持起到关键性调控作用。因此，骨稳态的失衡以及多种原因导致的骨退行性变严重影响着机体健康以及人民生活水平。国家每年在干细胞与骨稳态领域投资巨大，然而，骨稳态失衡以及骨退行性变的作用机理与治疗机制始终处于探索阶段而并无有效且特异性的治疗方法。骨骼干细胞作为骨骼系统重要的种子细胞，其自我更新与多向分化潜能为全身骨量及骨内环境稳态提供保障。目前，随着模式动物的应用与流式细胞学的发展，鉴定出多种来源的骨骼干细胞并逐渐发现其在骨修复与骨再生中的关键性作用。骨骼干细胞的分化失衡、自我更新能力减弱、凋亡、自噬以及衰老都将影响骨骼干细胞的命运，进而打破骨稳态，加速骨骼系统退行性变，严重影响着机体的健康。截至目前，不同来源骨骼干细胞间的优劣尚不清楚，其对骨稳态的维持以及骨量的贡献尚停留

在探索阶段，且参与不同模式成骨过程（膜内成骨、软骨内成骨）中的特异性干细胞种群仍需阐明；因此，本研究率先鉴定出骨外膜来源干细胞和肥大软骨细胞来源干细胞，并阐明其在骨稳态与不同骨形成过程中的重要作用机理。基于以上研究基础，通过建立多种骨退行性变模型，对骨髓间充质干细胞分化失衡、凋亡、自噬以及衰老在骨稳态失衡中的作用进行了系统性研究。本研究分为以下三部分：

第一部分 骨外膜来源干细胞的鉴定及其在骨稳态与骨再生中的作用机制

背景：皮质骨占全身骨骼重量的 80%，对躯体运动及脏器保护提供重要支持作用。青春期皮质骨量的维持以及发育期峰值骨量的多少严重影响着成年后机体骨质疏松的发生率以及骨折的预后。然而，皮质骨形成与损伤后的再生机制以及皮质骨稳态的调控机理尚不清楚，且参与皮质骨形成的骨外膜来源干细胞的鉴定一直是尚未解决的问题。有研究表明，骨髓腔中的 Nestin⁺、LepR⁺ 细胞分别在小鼠幼年以及成年作为主要的 MSCs 群落，参与松质骨的形成，但骨外膜来源干细胞的群落与表面标志尚未探明。因此，骨外膜来源干细胞的鉴定及其在皮质骨生长及稳态中的功能成为了亟待解决的问题。

目的：鉴定骨外膜来源干细胞，并探究其在骨稳态与骨再生中的作用。

方法：选取不同年龄段的 Nestin-GFP 小鼠、LepR-Cre; R26R; EYFP 小鼠，显微镜下分离骨外膜并用二型胶原酶消化获得骨外膜来源细胞，进行流式细胞学检测与分选，阐明其干性及多向分化潜能；并通过连续移植试验，探究骨外膜来源干细胞的体内自我更新能力；选取 Nestin-Cre; R26R; EYFP 小鼠和 LepR-Cre;R26R;EYFP 小鼠分别进行体内示踪，行免疫荧光及组织学染色；并通过多种模式动物模型特异性敲除 Trap⁺细胞及 PDGF-BB，探究不同皮质骨丢失与缺损模型中，骨外膜来源干细胞在皮质骨稳态及再生中的作用。

结果：通过流式细胞学检测，发现骨外膜来源的 Nestin⁺CD45⁻Ter119⁻CD31⁻细胞在青春期、LepR⁺CD45⁻Ter119⁻CD31⁻细胞在成年期高度表达干细胞表面标志物，并具有多向分化潜能。体内示踪实验中，发现 Nestin⁺细胞在青春期、LepR⁺细胞在成年期大量向成骨细胞分化，并促进皮质骨形成。通过观察 CSF-1 KO 小鼠、Trap-Cre; iDTR 小鼠、Trap-Cre; Pdgfr^{ff} 小鼠、CTSK KO 小鼠、Nestin-CreER;Pdgfr^{ff} 小鼠以

及 LepR-Cre;Pdgfr $\beta^{fl/fl}$ 小鼠骨外膜，发现在皮质骨缺失模型下骨外膜来源干细胞大量滞留于骨外膜外层，迁移至皮质骨表面受阻，且不影响其增殖活性。重要的是，通过建立皮质骨损伤模型，发现骨外膜来源干细胞受 Trap $^{+}$ 细胞分泌的 PDGF-BB 调控，并持续募集到骨损伤区域，参与皮质骨的稳态与再生。

结论：骨外膜来源的 Nestin $^{+}$ CD45 $^{-}$ Ter119 $^{-}$ CD31 $^{-}$ 细胞在青春期、LepR $^{+}$ CD45 $^{-}$ Ter119 $^{-}$ CD31 $^{-}$ 细胞在成年期为潜在的骨外膜来源干细胞，其自我更新和多向分化能力显著强于骨髓间充质来源干细胞，广泛参与皮质骨生长与损伤后再生。重要的是，我们首次发现骨外膜来源干细胞主要位于骨外膜纤维层，并受 Trap $^{+}$ 细胞持续募集到骨膜生发层和皮质骨表面进行膜内成骨，为皮质骨稳态的维持提供重要保障。

第二部分 骨髓间充质来源干细胞的异常分化、凋亡、自噬与衰老在骨稳态与骨退行性变中的作用

背景：骨髓间充质来源干细胞作为骨骼干细胞的一个重要分支，长期分布于骨髓腔中并处于相对静止的状态。其自我更新以及多向分化潜能，为骨骼系统的稳态与再生提供重要保障。近年来多项研究表明，骨髓间充质干细胞可受外界微环境与神经体液调控，进行自我更新、定向分化以及保护性自噬从而维持骨骼系统以及干细胞巢的稳态。然而，随着骨骼退行性变的发生，骨骼系统的自稳态与微环境发生改变，其内的骨髓间充质干细胞虽然有一部分可作为“后备力量”维持骨稳态并抑制骨骼退行性变的进展，但仍会有大量骨髓间充质干细胞分化异常、增殖受阻、凋亡增加甚至引起衰老。重要的是，干细胞的功能异常会进一步打破骨稳态，加速骨退行性变的发生，造成不可逆性的后果。因此，理清骨髓间充质干细胞的分化、凋亡、自噬和衰老在骨稳态与骨退行性变中的作用，并阐明如何通过调控改善以上病理过程，缓解骨退行性变的进程成为了目前骨骼干细胞与骨稳态领域面临的巨大挑战。

目的：阐明骨退行性变进程中骨髓间充质来源干细胞的分化异常、凋亡、自噬与衰老在骨稳态失衡中的作用。

方法：通过流式细胞学技术，分选 BMSCs 并建立多种骨退行性变模型：绝经后骨质疏松、糖皮质激素诱导性骨质疏松及骨衰老模型，在机体内观察骨退行性变

进程中骨髓间充质干细胞的生理与病理性表现；通过对退变模型中骨髓间充质干细胞分离培养并纯化，根据 Western Blot、RT-PCR、慢病毒干预、透射电镜以及免疫细胞学检测，观察骨退行性变与骨稳态失衡后骨髓间充质干细胞分化异常、增殖减弱、凋亡与衰老增加的具体作用机理以及分子机制；通过体内注射雌激素、不饱和脂肪酸和多种小分子药物，根据免疫组织学染色，micro CT、荧光双标、VG 染色、免疫印迹以及流式细胞学检测，明确骨髓间充质干细胞的调控是否可以改善骨退行性变的进程并维持骨稳态。

结果：通过上述检测，发现小鼠自然衰老模型中，MSCs 大量表达衰老标志物（P16、SA β -Gal）；另外，骨髓腔内血运减少、炎症因子分泌增加、长骨骨量减少、造血干细胞维持因子严重受损；髓腔内局部注射川芎嗪可通过 EZH2-H3k27me3 显著改善干细胞衰老，并逆转上述病理性过程。小鼠绝经后骨质疏松模型中，MSCs 细胞膜上 GPR40、GPR120 表达下降，成骨-成脂分化偶联障碍，骨量减少，而 EPA 与雌激素可分别上调 MSCs 中 GPR120 和 GPR40 的表达，扭转成骨-成脂偶联障碍；小鼠糖皮质激素诱导骨质疏松模型中，MSCs 凋亡显著增多，增殖能力下降，保护性自噬反应受到明显抑制；人参皂苷 Rb2 与 EPA 干预后，可显著抑制 MSCs 凋亡，且 EPA 可通过特异性的激活细胞保护性自噬反应，抑制细胞凋亡，从而改善激素诱导的骨稳态失衡。

结论：多因素导致的骨退行性变可以引起骨髓间充质干细胞的成骨-成脂分化偶联障碍、增殖减少、凋亡增加、自噬以及衰老。而 MSCs 的各种生物学功能障碍可进一步加重骨退行性变的进程并造成不可逆性结果。因此，通过调节 MSCs 的生物学功能或改善其病理学状态，对骨稳态的维持及骨退行性变的改善尤为重要。

第三部分 肥大软骨细胞来源干细胞的鉴定及其在骨稳态与骨退行性变中的作用机制

背景：传统观点认为，在胚胎期软骨内成骨过程中，软骨细胞历经肥大软骨细胞-终末期软骨细胞从而逐渐走向凋亡。课题组近期研究结果表明，肥大软骨细胞可直接经历转分化过程最终成为成骨前体细胞，参与胚胎期及出生后早期的松质骨形

成。相关研究表明，肥大软骨细胞向成骨前体细胞转分化过程中，可具有自我更新以及多向分化潜能，提示其可能为潜在的“干细胞”。然而，肥大软骨细胞在转分化过程中是否去分化为干细胞尚不清楚，且肥大软骨细胞来源干细胞的鉴定也备受关注。因此，肥大软骨细胞来源干细胞的鉴定及其在胚胎期及出生后早期如何调节骨稳态成为研究的热点；并且，在骨退行性变的过程中，肥大软骨细胞来源干细胞的转归及其在骨再生中的应用也急需阐明。

目的：鉴定肥大软骨细胞来源干细胞并阐明其在骨稳态及骨退行性变中的作用机制。

方法：通过使用肥大软骨细胞特异性标记小鼠 (Col10a1-Cre;R26R;TdTomato)，行免疫荧光染色，对肥大软骨细胞在胚胎期及出生后早期进行体内示踪；通过流式细胞学检测与分选，探究肥大软骨细胞来源干细胞的自我更新与多向分化潜能。通过使用肥大软骨细胞来源特异性清除小鼠 (Col10a1-Cre;DTA)，行 Micro CT、免疫荧光染色、流式细胞学技术阐明肥大软骨细胞来源干细胞在骨稳态中的作用。通过建立 Col10-Cre;R26R;TdTomato 小鼠绝经后骨质疏松模型，对其进行体内荧光示踪，理清肥大软骨细胞来源干细胞在骨退行性变中的转归。

结果：通过上述检测我们鉴定出了肥大软骨细胞来源干细胞，并发现其具有自我更新及多向分化潜能。特异性清除肥大软骨细胞来源干细胞可显著抑制躯体及四肢骨骼生长，并导致小鼠在出生后 21 天死亡。并且，肥大软骨细胞来源干细胞在骨质疏松模型中，成骨分化能力急剧降低，且可大量向脂肪细胞分化，影响着成年期骨稳态的维持。

结论：肥大软骨细胞来源干细胞具有自我更新及多向分化潜能，其不仅在胚胎期及出生后早期对骨稳态及造血系统的维持起到关键性调控作用，而且在骨质疏松发病进程中向脂肪细胞分化，在骨退变过程中影响骨稳态的维持。

关键词：骨外膜；骨骼干细胞；肥大软骨细胞；骨髓间充质干细胞；骨稳态；骨退行性变；骨髓微环境；骨再生。

Role and function of multi-lineage derived skeletal stem cells in bone homeostasis and degeneration

Candidate for master: Gao Bo

Supervisor: Prof. Luo Zhuojing

Tutor: Prof. Yang Liu

Department of orthopaedics, Xijing hospital, Fourth Military Medical University,
Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: National Key Basic Research Program of China (2011CB964703)
National Natural Science Foundation of China (No. 81572192)

Abstract

As one of the most significant living system in human being, skeletal system supports motivation and provides protection for the body. With in-depth research about skeleton, it gradually be recognized as one of the essential endocrine organ and participates in metabolism and homeostasis of several living system. Skeletal system includes multiple types of stem/progenitor cells accompanied with massive neurovascular network. The marrow in which not only support the hematopoiesis in early postnatal life, but also maintain the bone mass as the “seed cells bank” when we grow up. Therefore, the imbalance of bone homeostasis and deterioration of bone degeneration seriously affect the health and living standard of human. Until now, the country spends tremendous money on the area of stem cells and bone homeostasis, however, the pathology and treatment of the imbalance of bone homeostasis and bone degeneration still need to be explored and no effective therapeutic method have discovered. As the key “seed cell” resied in skeletal sytem, the self-renewal and multi-differentiation ability

guaranteed the maintainance of bone mass and bone homeostasis. Recently, multi-lineage derived skeletal stem cells have been identified and their essential role in bone repair and bone regeneration have also been investigated via the development of transgenic mice models and flow-cytometry. The dysfunction of skeletal stem cells such as the imbalance of differentiation, decreased self-renewal, increased apoptosis, impaired protective autophagy and even increased senescence significantly affect the fate of these cells, which further break the bone homeostasis and induce skeletal system degeneration and subsequently harm the health of whole body. Until now, not much is known about the relative advantages and disadvantages between different lineage-derived skeletal stem cells. Also, whether these cells from various lineage contribute to different bone formation process (intramembranous ossification and endochondral ossification) and homeostasis need to be elucidated. Therefore, this study is the first to identify periosteum-derived stem cells and hypertrophic chondrocyte-derived stem cells and further clarify the role and function of these cells in bone formation and bone homeostasis. By establishing multiple degeneration models, we systematically illuminate the consequence of impairment differentiation, apoptosis, authphagy and senescence of BMSCs in the imbalance of bone homeostasis. The whole studies are divided into three parts:

Part I Identification of periosteum-derived stem cells and their role in bone homeostasis and regeneration

Backgrounds: Periosteal cortical bone makes up about 80% of human bone mass and protects vital organs and supports the body movement. The cortical bone maintainance and peak bone mass in adolescent markedly affect the percentage of osteoporosis and prognosis of fracture. However, the mechanism of cortical bone formation, regeneration and homeostasis are largely unknown and the identification of periosteum-derived stem cells remains to be a question. “Nestin” and “LepR” have been regarded as the stem cell

marker for pubertal or adult MSCs respectively, and contributes to trabecular bone formation. However, not much is known about the cell markers for periosteum-derived stem cells. Hence, it is of great significance to identify the periosteum-derived stem cells (PDCs) and clarify the role and function of these cells in bone formation and homeostasis.

Objectives: To identify the periosteum-derived stem cells and clarify their role and function in cortical bone homeostasis and regeneration.

Methods: Firstly, we isolated periosteum-derived stem cells by using Nestin-GFP mice and LepR-Cre;R26R;EYFP mice of different ages and selected these cells via flow-cytometry analysis to clarify the self-renewal and multi-differentiation ability. By using serial transplantation assay, we claimed the *in vivo* self-renewal ability of Nestin⁺ or LepR⁺ periosteum-derived stem cells. Importantly, we performed *in vivo* lineage tracing of these cells by using Nes-Cre^{ER};R26R;EYFP mice and LepR-Cre;R26R;EYFP mice and performed immunofluorescence staining. Moreover, we explored the effects of periosteum-derived stem cells in cortical bone homeostasis and regeneration by using different cortical defect models from multiple transgenic mice of whether Trap⁺ cells specific elimination or PDGF-BB conditional knocked out.

Result: By using flow-cytometry analysis, we found that periosteal Nestin⁺CD45⁻Ter119⁻CD31⁻ cells in puberty and LepR⁺CD45⁻Ter119⁻CD31⁻ cells in adult highly expressed stem cell markers, possessed self-renewal and multi-differentiation ability and committed to osteoblasts under sub-renal transplantation. *In vivo* lineage-tracing further showed that the majority of Nestin⁺ cells in puberty and LepR⁺ cells in adult could differentiate to osteoblasts and induce cortical bone formation. By using multiple cortical defect models such as CSF-1 KO mice, Trap-cre; iDTR^{f/f} mice, Trap-Cre;Pdgfrb^{f/f} mice, CTSK KO mice, Nestin-creER;Pdgfrb^{f/f} mice and LepR-cre;Pdgfrb^{f/f} mice, we found that periosteum-derived stem cells mainly reside in outer layer of periosteum and could not migrate to periosteal surface. Of note, by establishing injury models of cortical bone, we found that periosteum-derived stem cells

were regulated by periosteal Trap⁺ cells and continuously recruited to the injury site to induce cortical bone regeneration and maintain cortical bone homeostasis.

Conclusion: Periosteal Nestin⁺CD45⁻Ter119⁻CD31⁻ cells in puberty and LepR⁺CD45⁻Ter119⁻CD31⁻ cells in adult were periosteum-derived stem cells and participated in cortical bone formation and regeneration. Their self-renewal and multi-differentiation ability were better than BMSCs. Of note, we are the first to identify that periosteum-derived stem cells mainly reside in the outer fibrous layer of periosteum and gradually be recruited by Trap⁺ cells to the cambium layer and periosteal surface for intramembranous ossification and further maintain whole cortical bone homeostasis.

Part II Role and function of abnormal differentiation, apoptosis, autophagy and senescence of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in bone homeostasis and degeneration.

Backgrounds: As one important subpopulation of skeletal stem cells, BMSCs remain quiescence and reside in marrow cavity. Their self-renewal and multi-differentiation ability maintain skeletal homeostasis and provide seed cells for bone regeneration. Recent studies showed that BMSCs were regulated by local microenvironment and systematic neurohumor to maintain skeleton homeostasis and stem cell niche. However, the differentiation, proliferation and protective autophagy of BMSCs can be seriously impaired due to bone degeneration and the unbalanced bone homeostasis and microenvironment, although minority of the BMSCs can still delay the bone degeneration process as “back up”. Of note, the dysfunction of BMSCs will further break the unbalanced bone homeostasis and accelerate the bone degeneration process, leading to irreversible consequences. Therefore, the clarification of the role and function of differentiation, apoptosis, autophagy and senescence of BMSCs in bone homeostasis and degeneration with their underlying therapeutic mechanism remain to be a huge challenge.

Objectives: To investigate the role and function of abnormal differentiation, apoptosis, autophagy and senescence of BMSCs in bone homeostasis and degeneration.

Methods: Using flow-cytometry analysis to purify and isolate BMSCs. By establishing multiple denegeration models: postmenopausal osteoporosis, glucocorticoid-induced osteoporosis and bone senescence model to investigate the physiologic and pathologic conditions of BMSCs in these models. By using westernblot, RT-PCR, lentivirus, transmission electron microscope and immunohistologic analysis to clarify the cellular and molecular mechanisms of the dysfunctioned differentiation, apoptosis, autophagy and senescence of BMSCs. By intraperitoneal injecting estrogen, unsaturated fatty acid, and multiple small molecular drugs *in vivo*, and performing immunostaining, micro CT, calcium double labeling, VG staining, immunoblot and flow-cytometry analysis, we can systematically clarify whether the modulation of BMSCs can improve bone degeneration and maintain bone homeostasis.

Result: We showed that BMSCs highly expressed the senescent markers “p16 and SAB-Gal” in bone senescence models with the decreased vascularization, increased inflammatory factors, decreased bone mass and impaired HSCs niche factors in bone marrow. Importantly, local delivery of Tetramethylpyrazine (TMP) in marrow cavity of senescent mice markedly upregulated EZH2-H3K27me3 and reverse the senescence of BMSCs and the above degeneration phenotype. Moreover, the expression of GPR40 and GPR120 in the membrane of BMSCs were decreased in postmenopausal osteoporosis with the unbalanced coupling of osteoblast-adipocyte. EPA and estrogen injection could significantly up-regulated GPR40 and GPR120 respectively, and reverse the unbalanced coupling of osteoblast-adipocyte. What’s more, we found the increased apoptosis and decreased proliferation of BMSCs with inhibited protective autophagy in glucocorticoid-induced osteoporosis. Of note, Ginsenoside Rb2 and EPA injection could makedly inhibit BMSCs apoptosis via promoting protective authphagy and improved the disrupted bone homeostasis caused by glucocorticoid-induced osteoporosis.

Conclusion: The impairment differentiation, proliferation, apoptosis, autophagy and

senescence of BMSCs are caused by skeletal degeneration and unbalanced homeostasis. Moreover, the dysfunctioned BMSCs will further aggravate skeletal degeneration and lead to irreversible consequence. Therefore, it is of great significance to modulate the biologic function and improve the pathologic conditions of BMSCs to maintain skeletal homeostasis and attenuate skeletal degeneration.

Part III Identification of hypertrophic chondrocyte-derived stem cells and their role in bone homeostasis and regeneration

Backgrounds: It is believed that chondrocyte will go through the process of hypertrophic chondrocyte, terminal hypertrophic chondrocyte and eventually cell apoptosis with the process of endochondral ossification during embryo. Our group recently discovered that hypertrophic chondrocyte could directly transdifferentiate to osteoblast and participate in trabecular bone formation both in embryo and early postnatal life. One study also showed that hypertrophic chondrocyte-derived cell possesses self-renewal and multi-differentiation ability before transdifferentiating to osteoblast, indicating its potential “stemness”. However, little is known about whether hypertrophic chondrocyte can dedifferentiate to stem cells and the identification of hypertrophic chondrocyte-derived cells needs to be defined. Therefore, it is of great significance to identify the hypertrophic chondrocyte-derived stem cells and clarify their role in bone homeostasis during embryo and early postnatal life. Also, it is urgent to understand the fate of hypertrophic chondrocyte-derived stem cells during bone degeneration and the application of these cells during bone regeneration.

Objectives: To identify hypertrophic chondrocyte-derived stem cells and clarify their role and function in bone homeostasis and degeneration.

Methods: By using hypertrophic chondrocyte specific Col10a1-Cre;R26R;TdTomato mice, and performing immunofluorescence staining to trace the fate of hypertrophic chondrocyte-derived cells in embryo and early postnatal life. By using flow-cytometry

analysis to investigate the self-renewal and multi-differentiation ability of hypertrophic chondrocyte-derived stem cells. By using hypertrophic chondrocyte specific elimination model (Col10a1-Cre;DTA mice), and performing micro CT, immunofluorescence staining, flow-cytometry to clarify the role and function of these cells in bone homeostasis. By performing ovariectomy in Col10-Cre;R26R;Tdtomato mice and lineage tracing *in vivo*, we could figure out the fate of these cells during bone degeneration.

Result: We are the first to identify hypertrophic chondrocyte-derived stem cells and determine their self-renewal and multi-differentiation ability. Specific deletion of hypertrophic chondrocyte-derived cells significantly inhibited skeleton growth and led to death in postnatal 21 days. Moreover, we found the decreased osteogenic differentiation and increased adipogenic differentiation of hypertrophic chondrocyte-derived stem cells in osteoporotic model, which markedly affected the maintenance of bone homeostasis.

Conclusion: Hypertrophic chondrocyte-derived stem cells possess self-renewal and multi-differentiation ability. They are essential to bone homeostasis and haematopoiesis not only in embryo but also in postnatal life. Moreover, they are one of the source for the increased bone marrow adipocytes during osteoporosis and maintain bone homeostasis during bone degeneration.

Key words: Periosteum, Skeletal stem cells, Hypertrophic chondrocyte, BMSCs, Bone homeostasis, Bone degeneration, Bone marrow microenvironment, Bone regeneration.

前 言

传统观点认为,骨骼组织作为力学承载系统,仅仅为机体提供支持与保护作用。近年来随着理论的革新,逐步发现骨骼系统为机体重要的内分泌系统之一,其代谢平衡与内环境稳态系统性的影响着机体多器官的功能与活性。骨骼系统内含有大量干/祖细胞,其来源的不同以及局部微环境的组成决定着骨骼干细胞的功能与命运。骨骼干细胞的自我更新与多向分化潜能使其成为治疗各类疾病的潜在靶点,随着我国《“十三五”国家科技创新规划》、《干细胞临床研究管理办法(试行)》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》的颁布,干细胞技术已被列为我国战略性、前瞻性重大科学问题,未来有望实现重大科学突破、抢占世界科学制高点。

骨骼干细胞包含多种骨骼系统来源的干细胞如骨外膜干细胞、骨髓间充质干细胞、肥大软骨细胞来源干细胞、关节软骨来源干细胞、滑膜来源干细胞、血管周干细胞等,其功能涉及到骨骼系统稳态的方方面面。例如,骨外膜干细胞广泛参与膜内成骨、骨膜稳态以及骨折后的再生;肥大软骨细胞来源干细胞广泛参与软骨内成骨、骨折后愈合;骨髓间充质干细胞为骨骼系统重要的“种子细胞”,其分泌的外泌体可参与影响全身多器官功能的维持;骨髓间充质干细胞在生命体早期参与全身造血系统的构建,且造血干细胞的增殖、维持以及造血系统的稳态依赖于骨髓间充质干细胞以及血管周干细胞分泌的各类造血维持因子如 SCF 和 CXCL12。

然而,骨骼干细胞的病理改变以及功能失衡严重影响着骨稳态并加速骨退行性变的进展(绝经后骨质疏松、激素诱导性骨质疏松、骨衰老等)。骨髓间充质干细胞的分化异常是髓内脂肪堆积的“罪魁祸首”,且其增殖能力减弱、凋亡增加、保护性自噬反应下降、衰老加重皆可破坏骨骼系统稳态,并促进骨骼系统退行性变。而骨骼系统的稳态失衡可导致微环境发生变化,氧化应激增加,进一步加重骨骼干细胞的功能异常,不可逆的引起的机体健康恶化。目前,随着生活节奏的加快以及

老龄人口的增多，骨骼退行性疾病的发生率逐年飙升并且几乎涵盖所有人群。雌激素缺失导致的骨质疏松好发于大多数绝经后女性，药物诱导性骨质疏松发生于各个年龄段对激素等药物冲击治疗下引起并发症的人群，老年性骨质疏松更是好发于青春峰值骨量低的人群中。在上述各种类型的骨骼系统退行性变中，骨骼干细胞的数量与功能都发生了改变，因此，通过对多种骨骼干细胞的鉴定并阐明其在骨退行性疾病中的变化将极大程度的改善疾病进展，提高人民生活质量。

随着干细胞应用在再生医学领域的迅速发展，利用流式细胞学技术、基因重组技术、组织工程技术大量扩增干细胞治疗骨骼系统疾病成为了潜在的治疗趋势；并且，不同来源骨骼干细胞的多样性功能不仅为骨再生提供“种子”来源，且对骨稳态的维持以及全身多脏器的功能稳定提供保障。值得注意的是，不同来源骨骼干细胞的鉴定尚不明确，其分布以及转归并无定论，且其生理功能以及病理性改变在骨稳态以及骨退行性变中的作用机制仍需阐明。因此，多种骨骼来源干细胞的鉴定及其在骨稳态与骨退行性变中的作用机理，以及潜在的应用前景，为本课题的具体研究方向。

文献回顾

干细胞领域的理论突破及技术进步使人们对组织修复和器官再生充满期待。随着我国迈入老龄化社会,骨退行性疾病人群的飞速增长对干细胞的应用、作用机理、治疗机制以及潜在风险提出了新的需求与挑战。为了实现这一需求,众多学者将研究目标聚焦在骨骼干细胞(Skeletal Stem Cells, SSCs)上。鉴于SSCs在体内的数量众多、功能强大、抗原性低以及对骨退行性疾病及骨缺损的潜在治疗效果,SSCs的起源、周围环境(niche)、自身内环境、命运转归及功能成为了近年来研究的重点与热点[1-3]。并且,随着近年来干细胞表面标志物的提出,SSCs的鉴定与纯化,以及在体内发挥效用的具体机制仍处于探索阶段,而这些不确定性将限制SSCs在组织修复与器官再生中的应用[3, 4]。

骨骼干细胞包含了骨骼系统内多种来源的干细胞。按起源分,可分为骨外膜来源(Periosteum-derived)干细胞[5]、骨髓间充质来源(Bone marrow mesenchymal-derived)干细胞[6]、肥大软骨细胞来源(Hypertrophic Chondrocyte-derived)干细胞、关节软骨来源(Articular Chondrocyte-derived)干细胞[7]等;按所处周围niche分,可分为静脉血管旁[8]、动脉血管旁[9]、网状组织旁[10]等;按细胞表面标志物分:可分为LepR⁺[11]、Nestin⁺[12]、Sca1⁺[13]、CD146⁺[14]、Gremlin1⁺[15]、Gli1⁺[16]与Pdgfra⁺[17]等。作为骨骼系统内关键的种子细胞,了解SSCs在生理及病理条件下的自身命运转归、功能优劣以及周围内环境变化将有助于我们更有效率的突破基于SSCs治疗的组织缺损修复及骨骼再生。

一、骨骼干细胞概述

骨骼干细胞(Skeletal stem cells, SSCs)不仅局限于出生后骨髓腔中的一群干细胞,而是包括骨外膜系统、骨内膜系统以及软骨来源在内的整个骨骼系统范畴内具有自我更新以及多向分化潜能的干细胞[18]。一般认为,SSCs的多向分化潜能主要是指其向软骨、骨、支持造血的间质以及髓内脂肪分化[19]。这些不同分化谱系在生理条件下通过一个特定的、良性的顺序从而组成连续性的骨骼系统,包括骨-骨髓、骨-骨膜、骨-关节等。骨髓中的SSCs是维系骨-造血系统的关键纽带,并且可作为

工具使我们更佳了解骨退行性疾病及髓内造血系统异常，从而找到潜在治疗方案[20]。骨骼干细胞涵盖范围广泛，包含骨外膜来源干细胞、骨髓间充质来源干细胞、肥大软骨来源干细胞等，在这里我们将系统性的介绍骨骼系统内不同来源骨骼干细胞的特性及命运转归。

（一）骨外膜来源干细胞

骨外膜分布广泛，覆盖于除关节软骨外几乎所有皮质骨外表面，并富含血管、神经与干/祖细胞，骨膜强大的成骨与成软骨潜能已被大家公认[21-23]。作为骨骼干细胞的一个主要来源，骨外膜来源干细胞不仅在皮质骨发育与生长方面起到关键作用，其对骨折愈合以及骨缺损的治疗同等重要[24]。近年来由于显微器械及相关分选仪器的发展，使我们可以更加深入的探究骨外膜来源干细胞的相关作用、具体功能以及其调控模式。

在分离提取骨外膜来源干细胞(Periosteum-derived Stem Cells, PDC) 时，需在显微镜下离断锚定在皮质骨上的 Sharpey's 纤维，并将提取下来的组织在合适的条件下经胶原酶消化、通过滤网并得到最终的细胞。分离的骨外膜干细胞在形态上呈成纤维状，且可在传代后维持自身形态[25]。虽然骨外膜干细胞没有表现出任何成骨细胞及脂肪细胞的特性，但骨外膜干细胞可在不同的体外环境中被诱导为成骨细胞、脂肪细胞以及软骨细胞，确定了 PDCs 的多向分化潜能[26, 27]。有证据表明，通过骨外膜细胞的单细胞分析，最终发现了骨外膜存在一群与间充质干细胞多能化相符的细胞种群，并在单细胞层面向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞以及肌细胞分化[28]。此发现随后在体内得到进一步证实，通过体外扩增的 PDCs 在体内移植试验中可向骨、软骨甚至形成具有造血能力的骨髓系统分化。与骨髓间充质干细胞相比，骨外膜来源干细胞在临床应用及骨科组织再生工程方面都要更强[29-31]。归其原因可能为机械应力的区别以及细胞所处内环境的变化，目前已有研究通过干预骨外膜的机械应力从而评估骨外膜的整体环境及应力对其影响，这将有助于阐明骨外膜干细胞在骨生长与骨损伤后所受到的外源性机械应力及生物物理信号[32, 33]。另外，骨外膜在缺损后，局部的干细胞如何迁徙到损伤区域并重塑内环境尚不清楚，目前已有多个研究尝试应用骨外膜干细胞搭载支架从而模拟受损的骨外膜干细胞层，但远期效果尚不明了[34]。所以，骨外膜干细胞的研究需要结合更多的临床结果，并通过多种手段，阐明骨外膜干细胞的理化特性，并基于此进一步深入探究骨外膜干细胞在骨再生与修复中的具体作用。

（二）骨髓间充质来源干细胞

骨髓间充质干细胞(BMSCs)是位于骨髓腔内的间充质干细胞 (MSCs), 是骨骼干细胞中数量庞大、应用广泛的一群种子细胞。由于 MSCs 最初在骨髓中发现并具有自我更新及多向分化潜能, 使得 BMSCs 成为目前临床与试验应用最为广泛的一群干细胞。骨髓间充质干细胞易于分离与培养, 采用全骨髓贴壁离心法或差异离心法, 可获得相对较纯的 BMSCs。当细胞接种入培养皿后, 原代接种的细胞在 24 小时即可贴壁, 且大体上成集落生长, 当接近长满后 BMSCs 呈“旋涡状”排列, 在形态上接近成纤维细胞样。在具体实验操作中, 研究者一般采取 P3-P5 的 BMSCs, 因为此阶段 BMSCs 的增殖及分化能力均达到最佳状态[35]。从特性上讲, BMSCs 主要具有以下几大特性: 1.强大的自我更新及定向分化潜能; 2. 具有免疫调节功能; 3, 来源方便, 易分离、培养、扩增及纯化; 4, 表面抗原不明显, 异体移植排斥反应较轻[36]。然而, BMSCs 也存在以下问题: 1.BMSCs 的数目与增殖分化能力将随着年龄的老化及机体的退行性变从而退化; 2.细胞制备过程中难以达到质量控制; 3.虽然免疫排斥反应小, 但仍有部分研究报道强调可能引起的免疫反应; 4.取材时对患者会有损伤[37]。

因此, BMSCs 的这些优缺点也正是目前促进与阻碍大量临床应用 BMSCs 的症结所在, 理清并阐明 BMSCs 的命运转归及其在骨退行性变中的具体作用机制, 将有助于研究者们解开症结, 提高 BMSCs 在组织修复与器官再生中的潜在应用前景。

（三）肥大软骨细胞来源干细胞

在骨发育过程中, 骨骼系统是由膜内成骨与软骨内成骨两种不同机制构成。其中, 软骨内成骨是脊椎动物骨骼的主要发育形式, 几乎参与形成除额骨、顶骨、上、下颌骨以外的所有骨骼系统[38-40]。当软骨内成骨过程开始时, 骨髓间充质干细胞聚集并向软骨细胞及软骨膜细胞分化, 而初始阶段的软骨细胞将通过有增殖活性的软骨细胞转变为无增殖活性的肥大软骨细胞 (Hypertrophic chondrocyte)。传统观点认为, 肥大软骨细胞为终末期分化细胞, 且凋亡是其不可避免的命运转归[41, 42]。然而, 这一关键性科学问题始终存在争议; 有研究表明, 肥大软骨细胞可直接转变为具有成骨分化潜能的成骨前体细胞[43, 44]; 也有观点认为肥大软骨细胞在特定发育条件下可去分化为干/祖细胞, 并在机体的不同需求下向多方向分化[45]。然而, 由于肥大软骨细胞缺乏体内的遗传学及荧光示踪的证据, 该科学问题尚未阐明。

我们知道，在发育期构成肢体的软骨雏形如果在分化过程中可直接转变为一类干细胞，那么对其进行生物学鉴定以及功能测定的意义将至关重要，因为这将改写教科书里对软骨命运的传统认知:软骨不可再生、软骨细胞随着分化的成熟将最终走向凋亡。最新研究表明，肥大软骨细胞除了可向成骨细胞分化以外，可重新获得细胞增殖能力，并贡献髓内 20%的脂肪细胞以及大量的血管周细胞。这些新发现将肥大软骨细胞转分化的意义推向了一个新高度[45]:提示肥大软骨细胞在转分化为成骨细胞之前，可能需要先经历去分化过程成为多向分化干细胞，并在特定条件下向成骨细胞或脂肪细胞转化。所以，理清并阐明肥大软骨细胞来源干细胞这一新的骨骼干细胞种群，并探究其生理功能及体内命运转归，将对其临床转化具有重要指导意义。

(四) 其他来源骨骼干细胞

骨骼干细胞涵盖范围广泛，除了骨外膜来源、骨髓间充质来源、肥大软骨细胞来源外，还存在有关节软骨来源与滑膜来源干细胞[46]等，这些细胞种群在特定部位以及特定的生长发育阶段，对关节软骨的再生以及关节炎的进展发挥调控作用。

有研究表明，在骨关节炎（Osteoarthritis）的“Early Stage”，关节软骨中有部分具有“Multi-potency”的细胞被激活并参与修复受损软骨。另外，研究人员发现软骨干细胞(Articular Cartilage Stem Cells, ACSCs)存在于关节软骨中，并在骨关节炎早期由静息态转变为激活状态，参与关节软骨的自我修复[47]。另有研究表明，关节软骨存在干细胞 pool，当生理发育需要或病理状态下应力改变时，存在于关节软骨内的干细胞会向下迁移，并发挥生物学功能[7]。

滑膜来源干细胞(Synovium-derived Stem Cells, SMSCs)在体内可在适当的刺激下向软骨细胞分化。有研究表明，滑膜组织来源的部分细胞具有自我更新(Self-renewal)和多向分化(Multi-differentiation)潜能。有趣的是，滑膜组织与关节软骨同样由相同的间充质前体细胞发育形成，且滑膜组织具有强大的再生能力[48-50]。如果通过关节镜获取 SMSCs，对身体侵入性将降低许多，且并发症少。SMSCs 因含量丰富、增殖能力强、生物稳定性强及软骨分化潜能等优点作为首选的软骨修复组织工程的种子细胞，临床前景值得关注[51]。

小结：骨骼干细胞(SSCs)涵盖有如骨外膜来源干细胞(PDCs)、骨髓间充质干细胞(BMSCs)、肥大软骨细胞来源干细胞(HC-MSCs)等功能重要且数量丰富的干细胞种群，也含有如关节软骨来源干细胞、滑膜来源干细胞等数量虽少但软骨修复功能强大的具有定向分化能力的干/祖细胞。这些细胞根据部位以及发

育的不同阶段，对机体骨骼系统的各个部位发挥着重要的调控作用。因此，理清并阐明多种骨骼来源干细胞的生理功能，并探究其在病理性骨退行性变过程中的作用机制具有重大的意义。

二、骨骼干细胞的鉴定及其命运、转归

（一）骨外膜来源干细胞的鉴定

骨外膜来源干细胞(Periosteum-derived Stem Cells, PDCs)形似典型的成纤维细胞样结构(与 MSCs 类似)，并呈现出细长型、纺锤形、三角形以及立方形[52]。部分研究表明，PDCs 形态均一；然而另有报道称 PDCs 可通过肉眼分辨出不同的种群；甚至有报道称 PDCs 在成骨或成软骨分化时，可呈现出立方型或多面体结构[53, 54]，并且，PDCs 的形态存在物种差异性，比如在相同的培养条件下，兔 PDCs 的大小要比人 PDCs 小[55]。

由于 PDCs 的形态大小差异性较大，所以研究人员通过流式细胞学技术，对 PDCs 的表面标志物进行了鉴定及划分。以往研究使用 MSCs 的表面标志物将 PDCs 进行提纯，这种方法有效的清除了众多“可能污染细胞”如包绕的肌肉，骨髓、骨、软骨、血液、以及其他可能接触到骨膜的组织[56]。PDCs 高表达 SH2、SH3、SH4、CD9、CD14、CD90、CD105 以及 CD166，而不表达 CD34、CD45 以及 CD106[57-60]。然而，在骨外膜细胞的体外培养中，常可见成骨前体细胞以及分化成熟的成骨细胞，提示这些学者们低估了骨外膜细胞的复杂性。尽管有研究通过使用 $CD9^+CD90^+CD166^+CD45^-$ 的 PDCs，但尚不清楚细胞提纯的方式是否准确，是否可以正确的反应出骨外膜干/祖细胞的生物学特性[60]。可见，骨外膜干细胞尚缺乏标准且准确的表面标志物。所以，骨外膜来源干细胞的鉴定及理清其在生理情况下的功能以及病理情况下的作用机制非常重要。

（二）骨外膜来源干细胞的命运转归

大部分 PDCs 经过传代后仍可保持高度的增殖活性并且不失去其分化能力。有趣的是，PDCs 的增殖活性显著强于 BMSCs，经过 30 代的传达培养后，PDCs 仍可保持其细胞增殖曲线；经过 80 代的传代培养后，PDCs 仍不表达衰老相关指标[31, 58, 61]。甚至从衰老患者骨外膜中直接提取的骨外膜细胞，仍可保持较强的增殖与分化活性，虽然其成软骨及成脂分化潜能随着年龄增长逐渐变弱[60, 62]。相比之下，从衰老供体中提取的骨髓间充质干细胞生长周期更

短,表现为细胞衰老以及端粒缩短。有研究表明,PDCs的单细胞培养鉴定中,可以看到PDCs在经过30代的传代培养后稳定表达细胞标记物,并且不依赖供体年龄表现出高度的增殖活性[63, 64]。

除了高度保持自身增殖活性外,PDCs在体内可向成骨细胞大量分化[65-67]。本课题组前期研究表明,PDCs可大量积聚于骨外膜的外层,通过皮质骨表面的Trap⁺细胞募集到皮质骨表面,分化成骨并促进皮质骨的形成与生长(图1)。与BMSCs不同的是,骨外膜内层高度表达骨膜素(Periostin, OSF, osteogenic factor),其不仅可促进细胞粘附,也可特异性的促进骨外膜细胞成骨分化,构建出骨外膜独有的成骨微环境[68-70]。有趣的是,骨外膜表面分布着大量的H型血管,其功能为偶联成骨-成血管作用,显著促进新生骨生长并改善局部的代谢活性[71, 72]。因此,骨外膜干细胞除了自身具有强大的增殖活性以及分化潜能外,其所处的成骨微环境将大幅度提高其成骨分化潜能,在皮质骨生长与发育过程中发挥作用。另外,骨外膜干细胞与BMSCs所受机械应力不同,当人为调控骨外膜应力如放置丝线、骨膜外生理盐水注射或手术松解都将促进骨外膜肥大、DNA合成、细胞增殖及骨骼生长[73-76]。体外研究中,像流体压力变化这种直接的应力刺激将会促进细胞增殖及成软骨分化[77, 78]。四点bending试验可以显著促进PDCs的成骨分化,而对MSCs无明显作用[79]。以上我们可以看出,PDCs更易受到机械应力调节,而MSCs则更多受到骨髓腔内的化学信号调节。因此,当具有高度应力结构的骨骼系统在生长发育与损伤后再生时,PDCs的应用将备受关注。

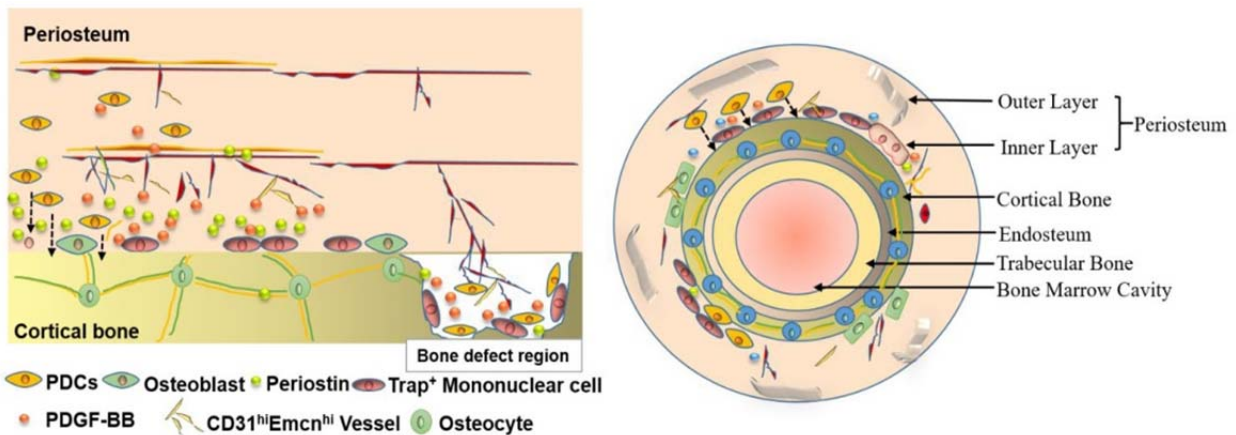
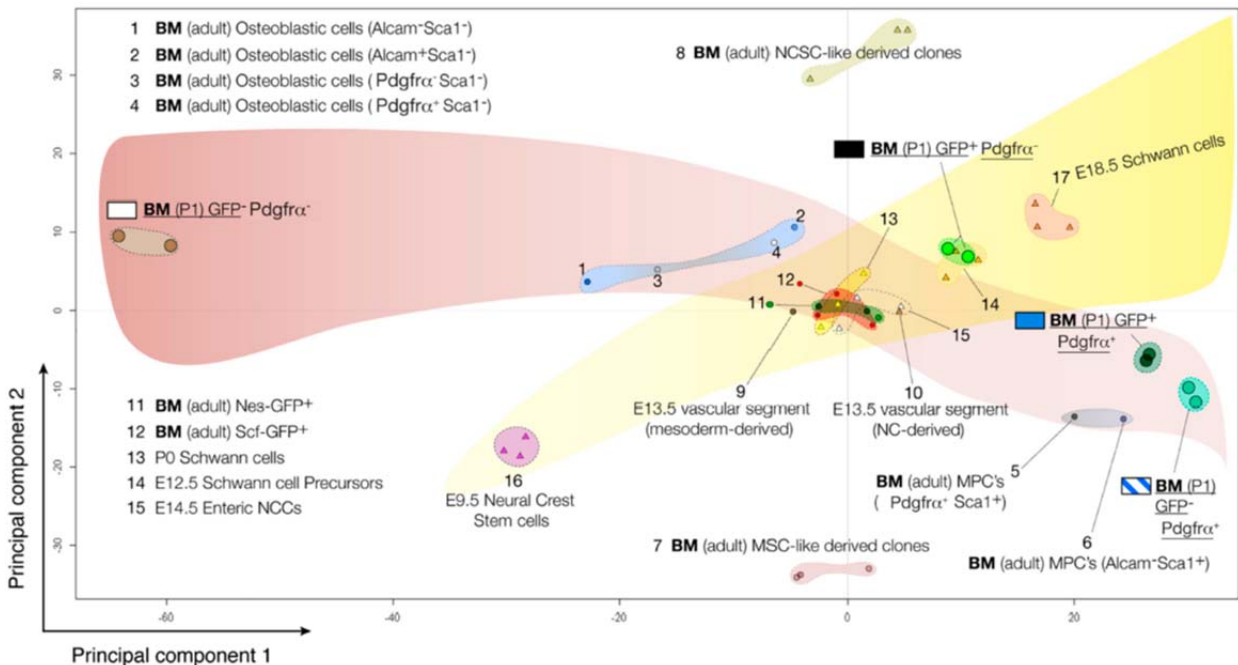


图1 骨外膜干细胞受Trap⁺细胞调节,参与皮质骨形成与皮质骨缺损修复

左图,骨外膜参与调控骨形成与骨修复示意图;右图,股骨横切面结构示意图展示骨外膜相对位置。

（三）骨髓间充质来源干细胞的鉴定

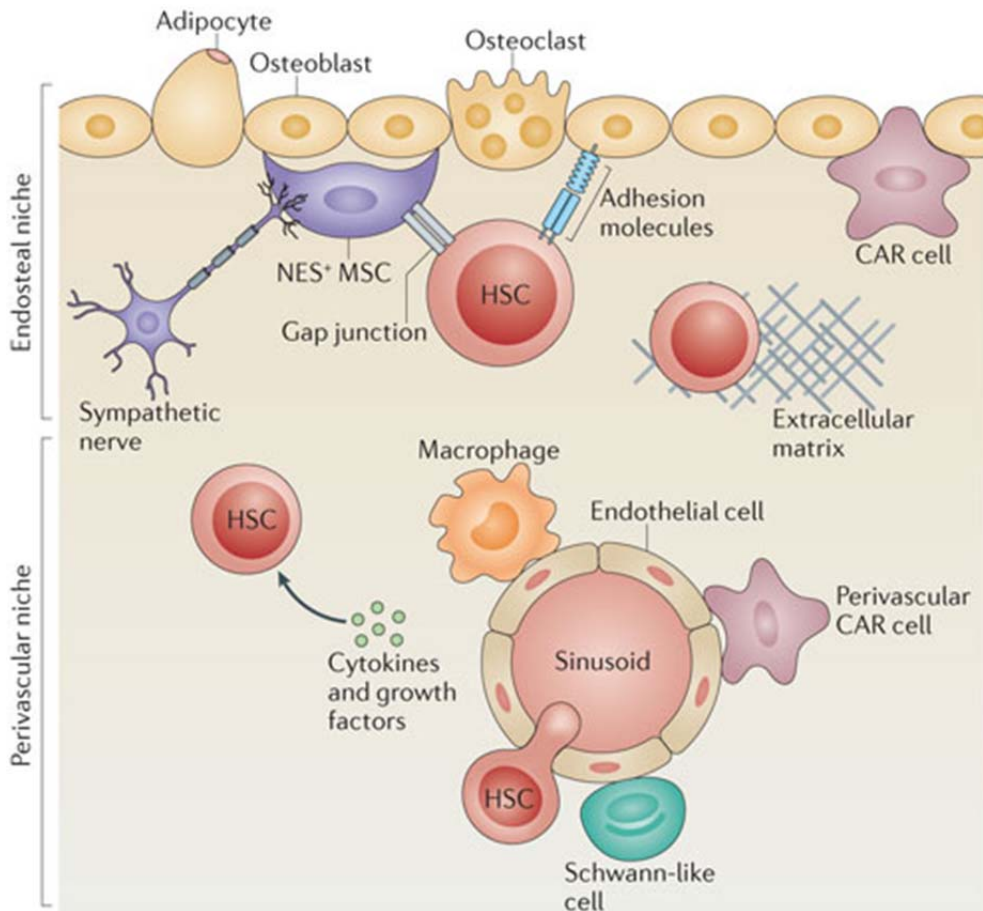
从大体形态上观察，细胞呈梭形或呈“成纤维细胞”样。在一定条件下可向成骨细胞、脂肪细胞或软骨细胞等方向分化。也有部分报道称，骨髓间充质干细胞可向非中胚层来源细胞如肝细胞或神经细胞分化[80, 81]，但这些结果往往相悖且没有在体内得到证实。BMSCs 来源于骨髓，具有自我更新和多向分化潜能。有研究通过将 BMSCs 皮下移植至免疫缺陷小鼠，发现在没有成骨诱导环境的部位长出了骨样组织，证实了其体外的成骨能力[82]。而且，通过连续移植试验将 BMSCs 注射入骨髓腔后，BMSCs 仍可保持其自我更新能力[83]。近年来，随着流式细胞学技术的发展，众多学者相继报道了 BMSCs 的表面标志物，并以此作为 Marker，研究 BMSCs 在骨稳态及骨退行性变的相关作用。目前已发现的 BMSCs 的经典细胞表面标志物如 Nestin、LepR、Gremlin1、Osx、Prrx1、Gli1、Sca1、CD146、Pdgfra、Pdgfr β 、CD90 及 CD105，且不表达 CD31、CD45、Ter119、CD11b 等（图二）[11, 12, 14-16, 84-87]。下面将 BMSCs 经典 Marker 分别予以介绍。



图二 骨髓间充质来源干细胞各个种群细胞标志物及其相互关系

3.1 Nestin⁺骨髓间充质干细胞

2010年,由 Paul Frenette et.al 课题组首先发现神经干细胞 marker –“Nestin”可以在骨髓间充质干细胞上表达[12]。通过 Nestin-GFP 转基因小鼠,研究者将 Nestin⁺细胞进行了定位,发现大部分 Nestin⁺细胞位于血管周,并与造血干细胞的数量与生理功能密切相关,且高度表达 CXCL12(造血维持因子),并且受交感神经支配(图三)。有趣的是,通过流式细胞学技术,将骨髓中的 Nestin⁺CD45⁻的细胞筛选出来体外培养,发现其具有较强的 CFU-F 形成能力,且在三系(成骨、成软骨、成脂)诱导过程中高度表达三系分化相关 marker,提示其具有自我更新及多向分化潜能。在体内连续移植试验中,研究者对 Nestin⁺细胞进行示踪,发现 Nestin⁺细胞可大量向成骨系细胞分化,也可部分分化为软骨细胞、血管旁细胞等。另外, Nestin⁺细胞高度表达多种造血维持因子,并促进髓内造血系统的稳定。



图三 Nestin⁺骨髓间充质干细胞受交感神经调控,参与偶联骨代谢与造血系统稳定

3.2 LepR⁺骨髓间充质干细胞

2014年, Sean Morrison et.al 课题组率先证明了表达瘦素受体 (LepR) 阳性的骨髓间充质细胞为成年小鼠髓腔内主要的干细胞群[11]。首先通过 LepR-Cre;R26;Tdtomato 小鼠, 证实了 LepR⁺的 MSCs 在髓腔内大量表达, 分泌 SCF (stem cell factor, 造血维持因子) 并且主要位于静脉旁。通过流式细胞学技术, 研究者发现髓腔内 LepR⁺细胞与 Pdgfra⁺细胞高度同源, 且高度表达 CD51 与 Pdgfr β 。然而, LepR⁺细胞对经典的干细胞 marker 如 CD105 的表达并不高, 且与 Sca1⁺细胞基本不重叠。这些发现都提示骨髓腔内存在多种干细胞群落, 并且在不同的部位行使多种生物学功能。将分选出的 LepR⁺细胞进行体外培养后发现, LepR⁺细胞包含了髓腔中大部分可以形成 CFU-F 的细胞, 并且在成年期大量向成骨系细胞分化。具体来说, 在生理情况下, LepR⁺细胞在胚胎期 E19.5 开始出现, 但在出生后 2 月前并不能显著参与全身骨形成; 当小鼠生长到成年期后(出生后 3 月), LepR⁺细胞可大量向成骨细胞分化。有趣的是, 研究者发现当小鼠进入成年晚期时, 髓腔内的脂肪细胞大部分是由 LepR⁺细胞分化而来, 但其对软骨细胞的贡献较少[88]。以上结果提示 LepR⁺骨髓间充质干细胞是小鼠成年期松质骨与髓内脂肪的主要来源, 并且独立于其他 BMSCs 种群, 位于髓内静脉血管旁, 通过分泌 SCF 从而维持造血系统的稳定。另外, 研究者通过在 LepR-Cre;R26R;TdTomato 小鼠胫骨建立骨折模型, 发现大量 LepR⁺BMSCs 可通过募集迁移到损伤区域, 通过软骨内成骨方式, 参与骨折修复。

3.3 Gremlin1⁺骨髓间充质干细胞

2015年, Timothy Wang et.al 课题组率先证明了骨髓内 Gremlin1⁺ (BMP 拮抗因子[89]) 的细胞为具有骨软骨形成能力的间充质干细胞, 并命名为 (Osteochondroreticular stem cells, OCR)[15]。研究者通过使用 Grem1-creER; R26-TdTomato; Nes-GFP 小鼠, 不仅发现了 Gremlin1⁺细胞具有自我更新及多向分化能力, 而且与 Nestin⁺细胞为不同的细胞群落。在体内荧光示踪定位 Gremlin1⁺细胞, 发现其在小鼠出生后早期可向生长板软骨细胞、关节软骨细胞、骨组织以及间充质组织分化; 成年期可向骨组织、软骨组织以及间充质成分分化, 但不能向脂肪细胞分化。与 LepR⁺BMSCs 不同的是, Gremlin1⁺间充质干

细胞并不在血管旁周围,而是大量积聚在干骺端以及第一松质骨区,参与成骨以及成软骨分化过程。研究者进一步通过建立小鼠股骨骨折模型,发现 Gremlin1⁺间充质干细胞大量参与骨折修复,并通过软骨内成骨方式,促进骨折愈合。此外,研究者通过流式细胞学技术,分析得出 Gremlin1 与 CD105⁺细胞高度同源,提示其为位于 metaphysis 的一群具有高度骨软骨分化能力的骨髓间充质干细胞。

3.4 Osterix⁺骨髓间充质干细胞

2010年,由 Henry M. Kronenberg et.al 课题组首先发现前成骨细胞 marker-“Osterix,Osx”可以在骨髓间充质干细胞上表达。传统观点认为,Osterix 只能作为干细胞成骨过程中的 marker,在分化过程中参与转录因子后表达修饰过程[90, 91]。在本研究中通过使用 Osx-CreER;R26R-TdTomato 小鼠对 Osx⁺细胞在体内进行荧光示踪,发现新生的 Osx⁺细胞是大部分髓腔内间充质细胞的起源,在早期主要聚集在 metaphysis,而在成年期可在 diaphysis 的骨髓腔中大量积聚;进一步研究表明,出生后 5 天起源的 Osx⁺细胞具有间充质干细胞的特征,即具有高度的 CFU-F 形成能力以及三系分化潜能。另外,出生后 Osx⁺细胞可以分化成为 Nestin⁺间充质干细胞,并高度表达 Pdgfra 和 Pdgfrβ。与 LepR⁺MSCs 不同的是,Osx⁺ MSCs 主要参与出生后早期的骨形成过程;而且,通过在 Osx-CreER;R26R-TdTomato 小鼠上建立骨折模型,研究者发现 Osx⁺细胞可被大量募集到骨折区域,并于 LepR⁺MSCs 一起,共同参与骨折修复过程。

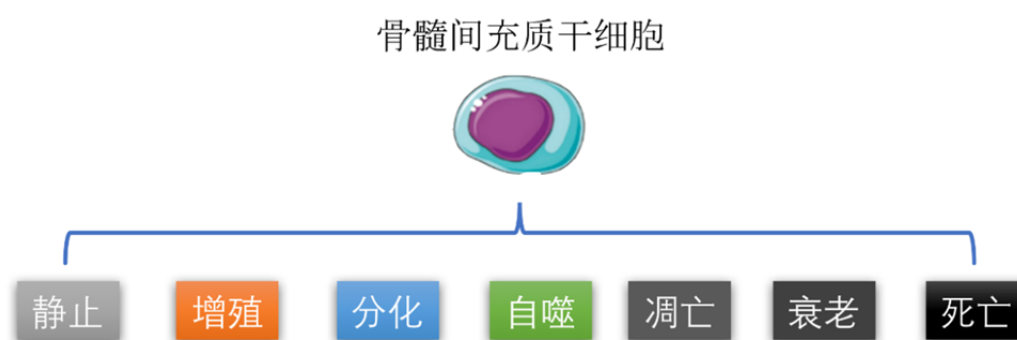
3.5 Prrx1⁺骨髓间充质干细胞

Prrx1 在胚胎发育期主要表达于中胚层,并且在成年期小鼠的间充质组织中高度表达。小鼠如果缺乏 Prrx1 将会严重影响颅面部干细胞的分化。Prrx1⁺骨髓间充质干细胞为目前较为经典的 BMSCs marker,但其不光在骨髓间充质中分布,还可作为皮质骨的起源细胞,在骨生长发育期共同参与骨骼系统的构建[92-94]。与上述几群 BMSCs 不同的是,Prx1 目前并无有效的可诱导型 Cre 小鼠,因此,对 Prx1⁺细胞的分析只能通过 Prx1-GFP 转基因小鼠或直接通过与 flox/flox 小鼠交联,从而在功能学上分析其在骨骼系统中的作用。有大量研究结果证实,Prx1⁺细胞除具有自我更新及多向分化能力外,还可在骨生长早期与晚期参与其调控过程。流式细胞学分析显示,Prx1⁺细胞高度表达 LepR、Pdgfra、

Pdgfr β 、CD90 与 CD105,且不表达 CD31 与 CD45,提示其为具有较高纯度的干细胞群落。另外,有研究在 Prx1-cre 小鼠中敲除雌激素受体 a (Estrogen receptor-a),发现皮质骨形成能力大幅增强[95];而在 Prx1-cre 小鼠中敲除 Foxp1,可导致骨骼系统过早的衰老[96]。以上结果提示,Prx1 为小鼠出生后骨髓腔内的一群非常重要的干细胞种群,其与 LepR⁺MSCs、Pdgfra⁺MSCs 高度同源,并在整个骨骼生长发育时期参与松质骨与皮质骨的构建,对骨骼系统的衰老起到关键性调控作用。

(四) 骨髓间充质来源干细胞的命运及其病理性转归

近年来,随着干细胞应用细则与国家标准的颁布,骨髓间充质干细胞在骨代谢与骨退行性变的发生机理中所扮演的角色受到越来越多的关注。生理条件下,BMSCs 在所处的 niche 中处于相对静止 (quiescence) 状态,并维持自我更新[97];当骨生长发育或骨损伤修复时,BMSCs 经骨原细胞,成骨前体细胞逐步分化成为成骨细胞,而成骨细胞通过形成新骨分泌类骨质并最终矿化成为骨细胞。然而,当机体骨骼系统发生退行性变时,BMSCs 的自身调控及微环境发生变化,其增殖与分化调控受到影响,并引发细胞自身一系列可逆与不可逆性状态如自噬、凋亡、衰老及死亡等(图四)。



图四 骨髓间充质干细胞的命运转归

4.1 骨髓间充质干细胞的增殖

干细胞及其所处的巢(niche)可使干细胞长期保持自我更新的状态,由于其微环境受到神经、血液、激素等多种因素调控,干细胞维持自我更新的具体内在机制尚不明确[98-100]。生理状态下,机体为了防止骨髓间充质干细胞的“枯

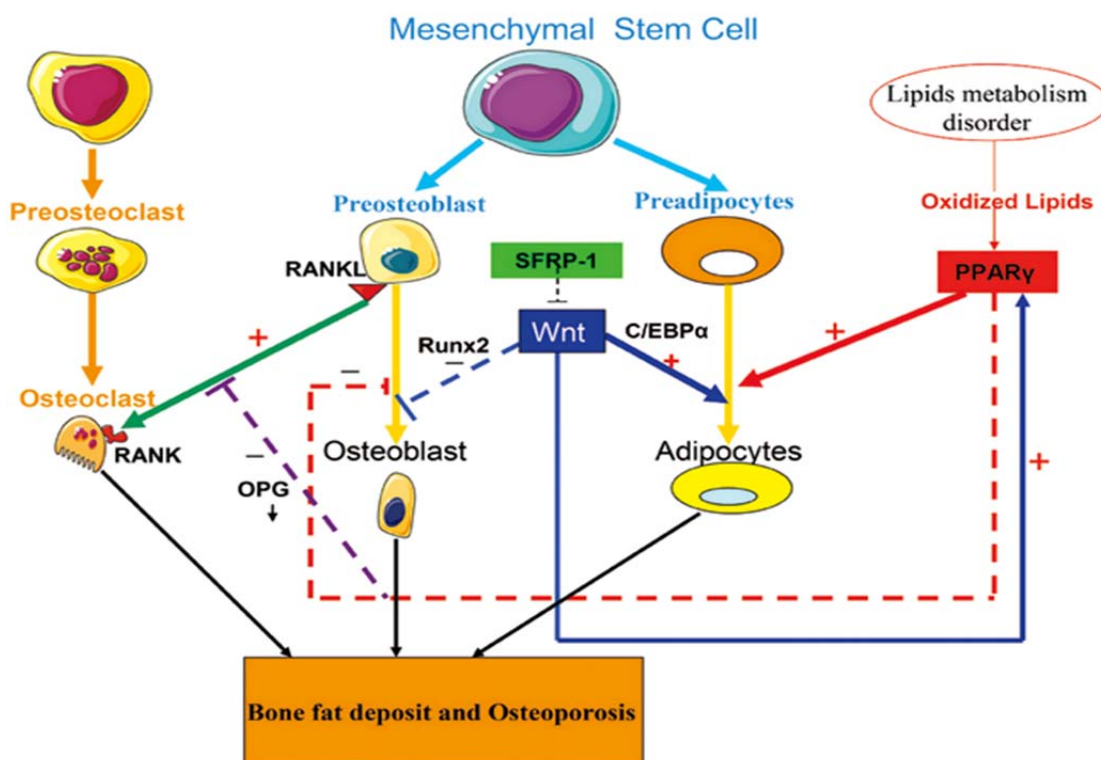
竭”，其增殖和分化会受到严格且精密的调控，以保证维持分化所需细胞的同时仍可有足够数量的干细胞从而维持机体的稳定性。具体来说，干细胞的增殖是干细胞发育过程中最基本的连续变化，当分化开始时增殖就会停止。研究者一般通过 MTT、CCK8 通过绘制生长曲线从而测定 BMSCs 的体外增殖情况[101, 102]。然而，细胞增殖不等同于干细胞的自我更新，而后者是指干细胞可通过对称或不对称分裂所产生的至少一个保留干细胞特性子代细胞的过程，而且是干细胞维持其终生具有分化潜能的基础。目前，只能通过干细胞体内连续移植试验（serial transplantation assay）来确认其自我更新能力[103]。

4.2 骨髓间充质干细胞的分化

骨髓间充质干细胞的起源是从最早的胚胎干细胞、多能干细胞直至发展成为具有组织特异性的多能干细胞。BMSCs 来源于中胚层间充质细胞，所以目前公认的 BMSCs 可分化成为的方向主要为成骨系细胞（Osteoblast-lineage Cell）、软骨系细胞（Chondrocyte-lineage Cell）、脂肪系细胞（Adipocyte-lineage Cell）以及间充质细胞（Mesenchymal Cell）等[104-106]。虽然有部分研究称在体外培养下，BMSCs 可分化为神经细胞或肝细胞[107, 108]，但这些研究的结果差异性太大，并且尚无体内结果证实。在骨发育早期，TGF- β 作为早期信号，促进 Fibronectin 合成并引发一系列粘附因子的出现，导致细胞骨架改变以及后续的间充质细胞大量聚集[109]。而后，Hox 通过激活 Shh 和 FGF，进而通过与 Wnt 家族之间的正负反馈作用从而大量促进间充质细胞的高度增殖与聚集[110]。随后，Wnt 可通过 β -catenin 促进间充质细胞成骨-成软骨分化，同时也可抑制 Ppar γ 从而抑制其向脂肪细胞分化[111, 112]。同时，Sox9 信号的出现也标志着间充质细胞向软骨细胞方向分化，并形成软骨雏形，周围的间充质细胞形成最初的软骨膜[113]。

骨骼的生长发育主要分为膜内成骨与软骨内成骨[38]，前者是间充质干细胞直接分化为成骨细胞的过程；而后者所指间充质干细胞首先分化为软骨细胞形成软骨雏形，随后被成骨系细胞替代形成骨组织的过程。骨发育阶段是间充质干细胞出现最早的分化过程，当初级骨化中心开始时，间充质细胞将大量向成骨方向分化，促进发育期骨骼的形成。当机体处于成年期时，骨髓腔中最初的红骨髓逐渐转变为黄骨髓，而黄骨髓中最主要的成分为骨髓间充质干细胞分

化产生的脂肪细胞。目前对髓内脂肪的功能仍处于探索阶段，并且尚不清楚髓内脂肪对骨发育及骨代谢的具体调控作用。有研究表明，骨髓间充质干细胞的成脂分化增加将同时抑制其向成骨细胞分化，反之亦然，并且与破骨形成过程相互联系，且最终将共同导致髓内脂肪增多，骨量减少，骨质疏松的发生(图五)[114, 115]。在骨骼退行性变如骨质疏松发展过程中，骨髓间充质干细胞受雌激素调控减少，导致其向脂肪细胞大量分化，导致髓内脂肪增多，微环境发生改变，进一步影响骨髓间充质干细胞的功能状态[116, 117]。当糖皮质激素过量导致的骨质疏松发生时，髓内微环境发生变化，血运减少，活性氧释放减少，氧化应激加重，大量骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化，导致骨量丢失，骨密度下降。另外，当机体发生骨折时，骨髓间充质干细胞将率先启动软骨内成骨过程，即在受损伤区域先形成软骨模型及骨痂，随后在进一步被骨组织替代[118, 119]。



图五 骨髓间充质干细胞的成骨-成脂偶联与骨质疏松的发生机制(引自[120])

4.3 骨髓间充质干细胞的凋亡

细胞凋亡是指细胞在一定的生理或病理条件下，受内在复杂而精密的遗传机制调控从而自动结束生命的过程。一般情况下，细胞凋亡会以细胞缩小、细

胞核浓缩、DNA 以核小体为单位切成阶梯状等形态变化为特点，且不引起周围细胞的溶解[121-123]。在骨骼系统内，当 BMSCs 受到短期高强度或长期高密度的病理性刺激下，将发生细胞凋亡，从而引起其增殖及分化受阻，严重影响骨代谢与骨稳态[124, 125]。在我们的前期研究中发现，临床中大量激素应用导致的骨质疏松中，其内的骨髓间充质干细胞大量发生凋亡，具体来说：通过流式细胞学 Annexin/PI 染色、Tunnel 染色、Caspase 3 试剂盒鉴定，我们明确了高浓度地塞米松可以导致骨髓间充质干细胞发生凋亡，而且发现人参皂苷 Rb2 以及二十碳五烯酸 EPA 可通过上调脂肪酸受体 GPR120,从而抑制下游的凋亡相关通路，从而抑制高浓度地塞米松导致的细胞凋亡。BMSCs 凋亡受到多基因严格控制，如 Bcl-2 家族、C-myc (癌基因)、Caspase 家族、P53 (抑癌基因)等[126]。虽然目前对 BMSCs 凋亡从机制上已经有一定的进展，但其确切机制尚不明了。并且，BMSCs 凋亡的发生可能与许多骨退行性疾病有直接或间接的联系。

4.4 骨髓间充质干细胞的自噬

细胞自噬又称为 II 型细胞死亡，是细胞溶酶体在自噬相关基因 (autophagy-related gene, Atg) 调控下降解自身受损细胞器和大分子物质的过程。目前自噬根据发生的过程主要分为三类：Macroautophagy、Microautophagy 以及 Chaperone-mediated autophagy, CMA[127-130]。总的来说，自噬是细胞对抗外界恶劣环境的关键性手段，比如在机体受到营养缺乏以及高温高压等恶劣的外在环境后，将通过自身复杂的调节过程，从而启动保护性自噬反应，达到应对细胞应激保护自身的目的[131-134]。有研究表明，干细胞内线粒体自噬可以减少线粒体的数量、下调线粒体活性，并诱导细胞进入长时间的休眠状态，减少线粒体代谢引起的一系列氧化应激反应[135-137]。另外，通过自噬反应可以维持骨髓腔中相对低氧的环境，从而可以保证骨髓间充质干细胞处于相对静止状态并保持自身干性[138]。在我们的前期研究中，发现二十碳五烯酸(EPA)可以通过激活 BMSCs 的 GPR120,引起下游 mTOR-LC3 信号通路的变化，从而激发细胞保护性自噬反应，缓解高浓度 Dexamethasone 引起的 Cell Autophagy。所以，BMSCs 的自噬不仅使其抵抗外界多种病理性干扰因素，也可通过对自身的调控作用维持周围环境并保持自身干性[139]。

4.5 骨髓间充质干细胞的衰老

细胞衰老(Senescence)是指细胞随着时间的推移,在执行生命活动过程中增殖与分化能力逐渐衰退的过程。理论上来说,正常细胞都需经过未分化、分化、生长、成熟、衰老及死亡的阶段。当细胞发生衰老时,将被机体的免疫细胞所识别并清除,同时将会有新生的细胞不断从相应的器官生成来弥补衰老的细胞。生理情况下,细胞衰老与细胞增殖处于动态平衡,而此平衡一旦打破将引起机体一系列的病理反应过程[140, 141]。当细胞衰老时,其细胞内水分减少、体积减小、新陈代谢毒素减慢;细胞色素累积、各种生物酶活性下降、膜通透性改变,物质运输功能降低[142]。中科院生物物理研究所通过多能干细胞定向分化、基因靶向编辑及表观遗传学技术,率先发现了异染色质高级结构失序是人干细胞衰老的主要驱动力之一[143]。而骨骼系统内的骨髓间充质干细胞衰老研究目前并不多,调控其衰老过程的主要基因有 P16、P21、P53 等[144-146]。在我们的前期研究中发现,骨髓间充质干细胞衰老受 Ezh2-H3K27me3 精密调控,当 BMSCs 发生衰老时, Ezh2 与 H3K27me3 表达下调,导致 H3K27me3 与下游结合的促衰老因子结合减少,通常情况下,前者与后者的结合将会抑制衰老下游基因的表达,当细胞发生衰老时,结合抑制作用减弱,促衰老基因显著上调,导致 BMSCs 衰老,骨退行性变的发生。我们通过筛选发现,川芎提取物四甲基吡嗪(TMP)可通过上调 Ezh2-H3K27me3,从而增加 H3K27me3 与下游结合的促衰老因子的结合,并且通过改善髓腔内衰老 BMSCs 的微环境,从内而外的延缓骨退行性变的发生[147]。

(五) 肥大软骨细胞来源干细胞的鉴定与命运转归

有关肥大软骨细胞来源干细胞(Hypertrophic Chondrocyte-derived Stem Cells, HC-MSCs)的相关报道目前仅有一篇。该研究表明,通过体内示踪 Col10a1-Cre;R26R;Tdtomato 小鼠,可以发现 Col10⁺细胞在终末分化期没有全部走向凋亡,部分细胞反而转变成了形态学上类似“成纤维状”的细胞,其不光在干骺端分布,也广泛分布于骨髓腔及骨内膜下,提示其可能为潜在的间充质细胞[45]。目前尚没有任何有关于肥大软骨细胞来源干细胞的鉴定,本研究拟采用小鼠骨髓腔内 CD45⁻TER119⁻CD31⁻细胞并结合 Col10a1-Cre;R26R;Tdtomato⁺从而筛选出

一群潜在的肥大软骨细胞来源的干细胞群落，并通过流式细胞学技术将此亚群干细胞与其他亚群进行多方位的比对，从而确定肥大软骨细胞来源干细胞。

此前研究表明，体内示踪 Col10a1-Cre;R26R;Tdtomato 小鼠发现 Col10⁺细胞可直接向成骨细胞转分化，并贡献了松质骨中近 30%的成骨系细胞，提示其具有向成骨系细胞直接转化的能力[43]。有趣的是，通过免疫组化染色脂肪相关 marker Perillipin 与血管周细胞 marker Pdgfr β 以及血管内皮细胞 marker Emcn 后，发现肥大软骨细胞来源干细胞除了向成骨细胞转分化以外，可发生去分化过程并重新获得细胞增殖能力，并且贡献了髓内 20%的脂肪细胞以及大量的血管周细胞，进一步证实了 HC-MSCs 作为一群新发现的干细胞群落的潜在“干性”。

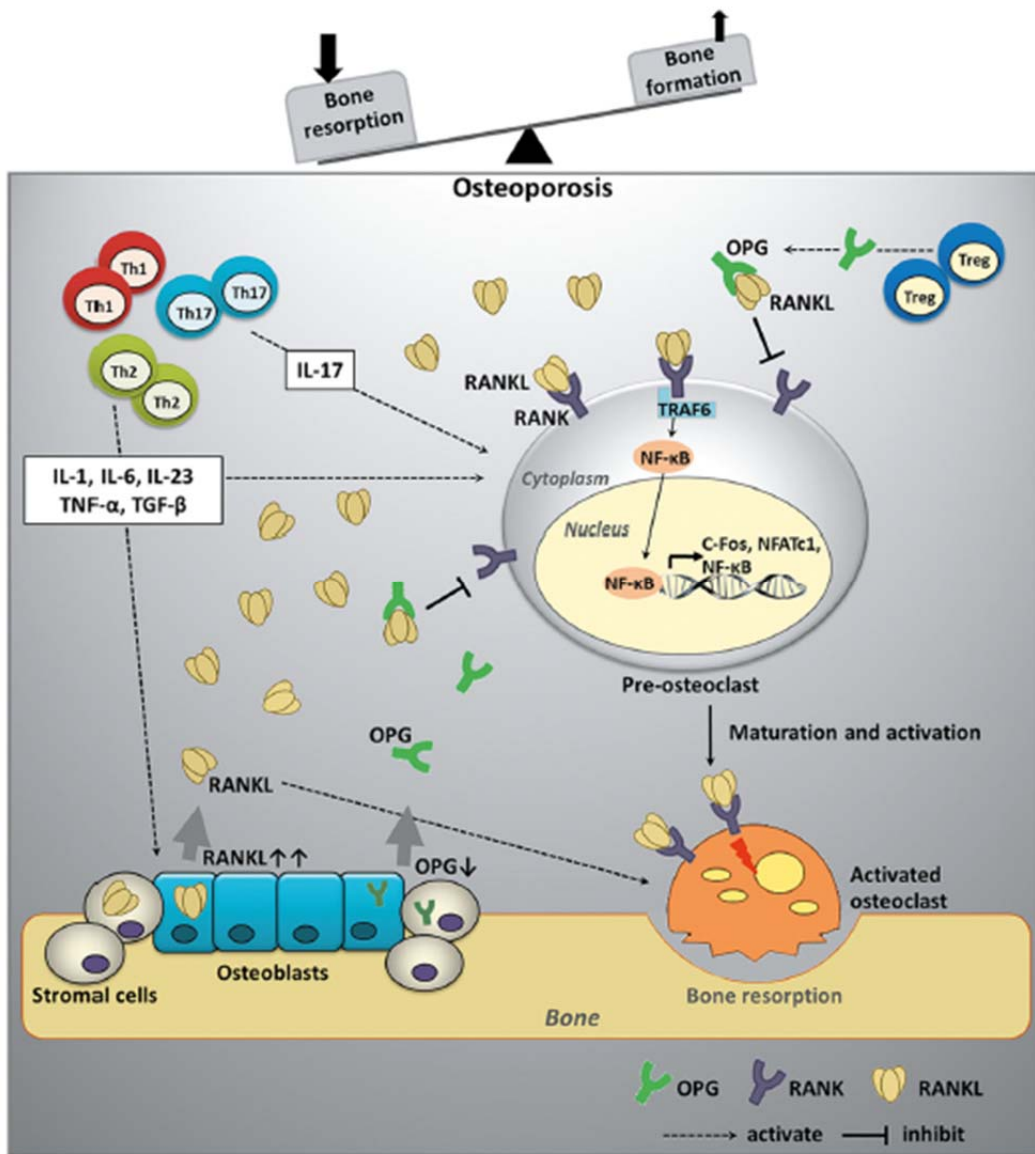
小结：骨骼干细胞是机体中含量最广的种子细胞库之一，其数量的维持以及正常生理功能的实施将严重影响着整个机体的代谢平衡及内分泌调控过程。由于不同来源的骨骼干细胞身处骨骼组织不同的区域如骨髓腔、骨外膜表面、关节软骨处，其所受的外周机械应力、代谢因子与神经血液调控皆不同，而这些差异也将引起细胞自身的状态以及其命运转归。当干细胞的命运发生病理性变化时，将发生像“蝴蝶效应”般的级联反应，从而引发骨骼系统多处退行性变化；不仅如此，骨髓间充质干细胞对造血系统的强大支持作用也将随着其病理性命运转归逐渐消弱、甚至产生负性调控作用。因此，了解不同来源骨骼干细胞的正常生理功能以及病理性命运转归的内在机理，将从根本上改善骨退行性疾病的发生与进程。

三、骨稳态平衡与骨退行性变的研究进展

（一）骨稳态平衡与失衡

骨组织的功能包括软组织的机械支持、肌肉活动的杠杆、中枢神经系统的保护、通过释放钙与铁从而维持细胞外液的离子环境以及造血系统的支持作用。骨骼的结构及骨量的多少，无论从宏观还是微观都是由遗传谱系及多种调控因子决定[148-151]。骨骼系统从出生后始终处于重建与塑建的过程中。传统观点认为，骨的生理活动主要由成骨细胞介导的骨形成与破骨细胞介导的骨吸收导致，而骨形成与骨吸收的动态平衡维持了骨骼系统的稳态，当骨吸收增加、骨形成减少时，将导致骨质疏松的发生与发展；当骨形成增加、骨吸收减少时，将引起诸如骨硬化症等疾

病(图六)[152-154]。近年来,随着骨代谢领域研究的进展,逐步发现骨骼作为一个庞大的内分泌系统,其功能不仅仅是支持与稳定,而且可调控糖、脂内分泌代谢以及造血系统稳定等一系列生物学过程[155-159]。目前,骨代谢平衡指的是骨骼系统内包括器官、组织、间质、细胞甚至分子层面保持动态平衡以及相对稳定的状态;当其中某个部分出现轻微的调控异常,骨骼系统的自稳系统将会代偿并修复病变部分,让骨骼系统重新回归稳定;然而,当髓腔内代谢微环境发生改变,或骨骼系统的种子细胞发生功能障碍,将会使骨骼系统稳态发生不可逆性失衡,打破偶联,进一步加重微环境的病理变化,诱导骨退行性变的进程,造成病态循环。



图六 骨稳态平衡是由成骨细胞介导的骨形成与破骨细胞介导的骨吸收动态平衡所决定 (引自[160])

(二) 骨退行性变

2.1 骨质疏松

骨质疏松 (Osteoporosis, OP)是由环境因素与遗传因素共同调控,以全身多处骨量减少、骨代谢失衡、骨微结构受损为特征,表现为骨骼重建-塑建失衡、骨强度降低、骨密度下降以及骨折发生率升高及骨折预后下降的一种复杂、多因素、全身性的慢性骨退行性疾病[161-165]。病因学上,骨质疏松可分为原发性(Primary Osteoporosis)与继发性骨质疏松(Secondary Osteoporosis)。原发性骨质疏松主要分为绝经后骨质疏松与机体衰老所致的老年性骨质疏松[166, 167];继发性骨质疏松主要包含药物诱导型(如糖皮质激素)[168]、营养缺乏性骨质疏松[169]、废用性骨质疏松[170]、全身继发性疾病如内分泌性皮质醇增多症[171]、慢行肾功能衰竭[172]、甲状腺功能亢进症[173]、肢端肥大症[174]、糖尿病等[175]。

2.1.1 绝经后骨质疏松

绝经后骨质疏松主要由雌激素水平显著降低所引起。此外,绝经后骨质疏松还受物理因素、营养因素、外界环境、免疫因素和家族遗传因素共同作用[176-180]。目前,全世界大约有两亿人罹患骨质疏松症,而在西方国家的女性中,平均每四人就有一人患病,发病率不可谓不高。我国是人口大国,平均有 30%的女性患有骨质疏松症,在防治骨质疏松及其并发症的过程中给国家、社会及个人带来了严重的经济负担及精神负担。因此,对绝经后骨质疏松发生的内在机理以及治疗措施甚至发病前的防治尤为重要。

2.1.2 老年性骨质疏松

老年性骨质疏松的发病人群主要集中在 70 岁以上的老龄人群,且在女性中更为常见。由于老年性骨质疏松退行性变发展严重,其皮质骨同松质骨一样,都将发生严重的骨量丢失、骨密度下降、骨折风险增加[181-185]。在老年人群中,骨折部位多见于股骨、腰椎以及尺桡骨。随着我国逐渐步入老龄化社会,老年性骨质疏松的发病人群将大幅提高。老年性骨质疏松与其他类型骨质疏松有所区别,其骨骼干细胞的分化与增殖能力都将显著下降,并出现广泛的衰老表型;当干细胞出现 SASP 时(Senescence-associated secretory Phenotype)时,将引起包括局部微环境在内的多因

素发生改变，从而广泛的引起骨骼退行性变的发生。所以，理清老年性骨质疏松的发病机制至关重要。

2.1.3 糖皮质激素性骨质疏松

糖皮质激素性骨质疏松 (Glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP) 是 Secondary Osteoporosis 中最为多见的类型，在 20-45 岁人群中好发。流行病学研究显示，糖皮质激素性骨质疏松常发生于连续使用 Glucocorticoid 治疗超过 3-6 个月的患者以及短期大剂量注射糖皮质激素的患者中。GIOP 主要表现为骨量减少，这也是与绝经后骨质疏松 (Post-menopause Osteoporosis) 的主要鉴别点，因为绝经后骨质疏松的主要病理生理改变为显著增强的骨重建。GIOP 的主要表现为骨量 (Bone Volume) 的显著减少以及骨脆性增加，成年好发骨折 (30%-50%) [186-190]。

2.2 骨衰老

骨骼系统衰老 (Skeletal senescence) 主要特征为骨吸收显著增强、骨形成大幅度下降；表现为骨皮质变薄、松质骨间隙增宽、骨基质减少或消失、骨密度下降、骨脆性增高，极易发生骨折。骨衰老与衰老性骨质疏松有所不同，前者除骨骼系统发生退变外，其髓腔内黄色脂肪大量积聚、氧化应激增强、血供下降、造血系统紊乱，导致微环境显著破坏。骨髓间充质干细胞不仅仅表现为成骨能力下降，还表现为显著增加的衰老征象，从而引起干细胞功能失调，导致骨稳态失衡[191-195]。从治疗学分析，骨质疏松主要根据骨形成降低以及骨吸收增加来诊治；而骨衰老需要从根上解决问题，即通过小分子药物针对细胞衰老征象进行靶向治疗，并同时改善骨骼系统微环境紊乱，从而治疗骨衰老引起的多方面病理性改变。

小结：骨骼在胚胎期的发育、出生后的生长以及成年期的维持依赖于骨稳态。骨稳态平衡由内因与外因共同调控，其中，外部因素包括环境因素与机械应力等共同作用；内部因素包括神经调控、体液调控、细胞自身代谢以及与其他系统互作等多因素调控。骨骼系统的自身稳定性可使其在上述多因素中受到小幅度影响仍可维持其自身稳态平衡，而当内因或外因发生剧烈改变时，骨骼系统打破平衡，骨稳态失衡，导致骨代谢以及内环境发生改变，从而引发骨退行性变的发生。

骨退行性变是人一生中无法避免的骨骼病理性改变。由于骨稳态失衡，骨骼系统内如骨骼干细胞、成骨细胞、破骨细胞、骨细胞、脂肪细胞、免疫细胞、内皮细胞、血管周细胞甚至造血干细胞都因自身以及周遭环境的变化从而发生病理性改变。当外部病理性干预如雌激素缺失、衰老、糖皮质激素滥用持续发生且得不到有效改善时，骨退行性变将会持续进展并逐渐从细胞分子水平发生不可逆性的改变。因此，阐明骨稳态平衡的内在条件以及探究骨退行性变的分子机理，将为临床改善骨退行性变以及靶向治疗提供潜在的可行性方案。

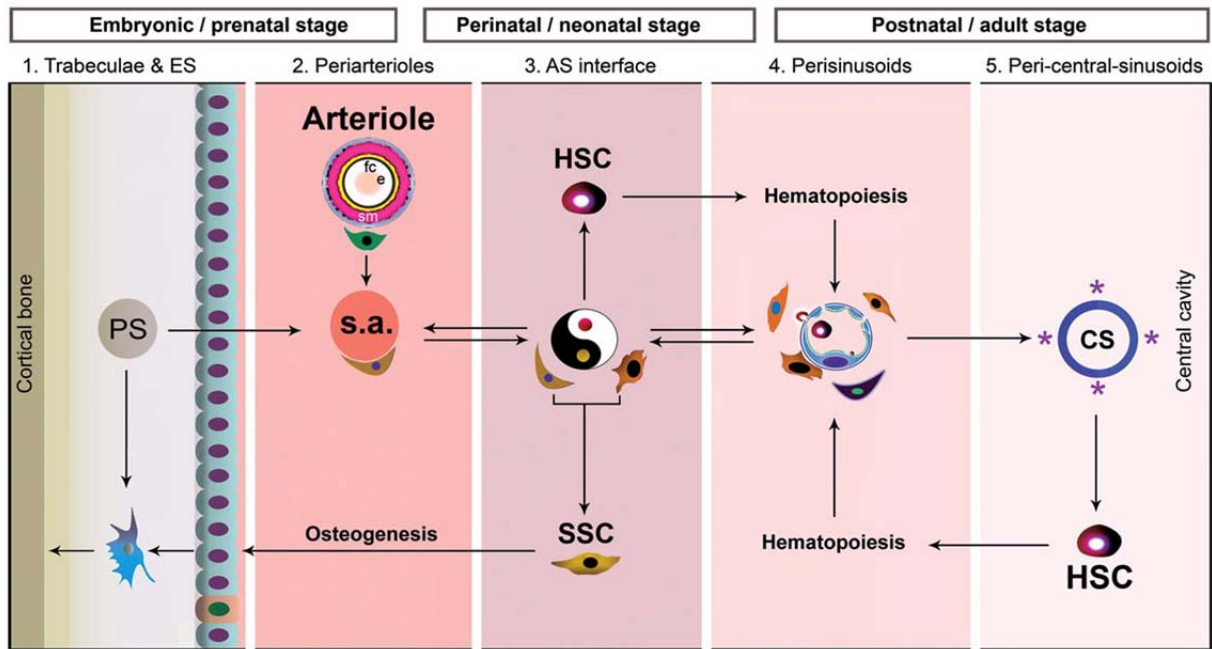
四、骨骼干细胞在骨稳态及骨退行性变中的研究进展

根据前文的介绍，我们已经大致了解到当骨稳态失衡以及骨骼系统发生退行性变如原发性、继发性骨质疏松以及骨衰老时，骨骼系统的外在干扰因素及内在环境的变化将导致骨骼干细胞的生理功能及命运转归发生改变。那么，从始动因素分析，如果骨骼干细胞的增殖与分化出现异常，并引起继发的细胞凋亡、自噬甚至衰老时，能否直接引发骨稳态失衡以及骨退行性变的发生呢？

骨骼干细胞的涵盖范围广泛，包含骨外膜来源干细胞、骨髓间充质来源干细胞、肥大软骨细胞来源干细胞、关节软骨来源干细胞、滑膜来源干细胞、血管周干细胞等；其功能除自身成骨、成脂、成软骨分化外，也可通过分泌多种细胞因子，维持多系统的稳定性[196-200]；另外，近年来研究表明，骨骼干细胞可通过分泌外泌体，从而调控骨骼系统的稳态[201-203]。具体来说，骨外膜干细胞作为皮质骨形成的重要来源，受骨外膜 Trap^+ 细胞的募集，持续迁移到骨表面，通过膜内成骨方式参与皮质骨形成；当皮质骨缺损或骨折时，骨外膜干细胞被募集到损伤区域，通过软骨内成骨方式参与损伤修复过程。当骨外膜干细胞增殖能力下降、迁移功能受阻或分化成骨、成软骨受影响时，皮质骨稳态将被严重打乱，其生理情况下的骨形成以及损伤后的骨修复都将受到影响。骨髓间充质来源干细胞作为骨髓腔内数量最多的骨骼干细胞群落，其生理功能涵盖广泛。当骨髓间充质干细胞由于凋亡增加导致增殖能力下降时，松质骨形成以及损伤后的骨修复能力将显著受损；此外，骨髓间充质干细胞成骨分化能力下降且成脂分化能力增强时，骨髓腔内脂肪细胞增多，氧化应激增加，髓腔内血运减少，导致骨质疏松的发生率显著增加；当骨髓间充质干细胞发生衰老

时,其分泌的 CXCL12 以及 SCF 等造血维持因子大幅下降,导致造血干细胞减少、功能下降,造成造血系统紊乱[147];另外,位于血管内皮细胞旁的骨髓间充质干细胞由于其自身凋亡或衰老引起的功能受损将影响内皮细胞的增殖与血管束形成,从而导致髓腔内血管-骨偶联发生破坏,导致新生骨形成受阻、内环境功能失调(图七);重要的是,骨髓间充质干细胞的数量减少或功能下降可使骨髓内免疫细胞功能下调,导致机体的免疫系统紊乱,免疫力下降。肥大软骨细胞来源干细胞对骨骼生长发育起到至关重要的作用。前期研究中证实,肥大软骨细胞可直接转分化为成骨细胞,除参与早期软骨发育进程外,也可广泛参与骨生长及病理性骨缺损修复过程。在本研究中,通过观察 Col10a1-Cre;DTA 小鼠,我们发现肥大软骨细胞来源干细胞大量位于松质骨及骨内膜表面,除参与松质骨形成外,还可参与造血系统维持以及成年期髓内脂肪的聚积等多方面的生理过程。关节软骨来源干细胞在生理情况下作为关节处的种子细胞库,参与创伤后退行性骨关节炎病变后关节软骨在微损伤过程中的修复过程。当关节软骨来源干细胞数量减少或功能下降时,关节软骨的修复过程将显著受损,导致骨关节炎进一步恶化[204, 205]。血管周干细胞由于其自身高度表达 β_3 -adrenergic 受体,可直接受交感神经调控,分泌 Cxcl12,从而调控造血干细胞功能及数量稳定;另外,血管周干细胞可通过分泌多种因子,从而建立骨髓间充质干细胞的 perivascular niche,通过改变髓腔内环境从而调节骨稳态平衡。

有研究表明,将生理功能正常的骨骼干细胞注入到退行性变小鼠血液内或直接注入到骨髓腔中,可显著改善如绝经后骨质疏松、衰老性骨质疏松引起的骨骼退行性变及髓腔内微环境破坏[206, 207];另外,通过小分子药物特异性清除小鼠髓腔内衰老干细胞可显著扭转骨衰老引起的造血系统功能失常、生长因子分泌减少、炎症因子释放增多、血运破坏以及松质骨骨量减少[147];给予绝经后骨质疏松小鼠雌激素治疗后,可显著促进其增殖活性、成骨分化能力并降低其成脂分化潜能,从而改善骨质疏松的骨量丢失及骨稳态失衡[208]。所以,针对调控骨骼干细胞的生理功能从而改善骨稳态平衡将成为未来骨退行性疾病潜在的可行性治疗方案。



图七 骨骼干细胞从胚胎期到出生后成年期参与调控骨形成并偶联骨骼系统、造血系统与脉管系统的代谢平衡（引自[209]）。

小结：随着骨代谢领域研究的深入，骨稳态平衡已经不是单纯的成骨细胞介导的骨形成与破骨细胞介导的骨吸收之间的动态平衡。究其根源，可发现骨骼干细胞作为骨骼系统重要的种子细胞，对维持骨稳态平衡起到关键性的调控作用。由于骨骼干细胞涵盖面广，功能复杂，其自身的生理性增殖、分化、自噬以及病理性的凋亡与衰老，都将影响着骨骼系统、造血系统、免疫系统、神经血液系统以及全身糖脂代谢等多种关键性生物学过程。因此，阐明骨骼干细胞在骨稳态平衡及骨退行性变过程中的潜在分子生物学机制非常关键，我们可通过基因靶向干预、小分子药物治疗以及异体干细胞移植等多种方案治疗骨退行性变的进展，从而恢复骨稳态。现如今，随着我国多项干细胞法规如《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）》和《干细胞临床研究管理办法（试行）》的颁布，发展干细胞技术已成为我国现阶段应用领域与未来战略方向的重中之重。然而我们需要明白，大多数的研究仍处于基础研究阶段，还有很长的路要走。

正文

第一部分 骨外膜来源干细胞的鉴定及其在骨稳态与骨再生中的作用

骨外膜分布广泛，被覆于除关节外几乎所有的皮质骨表面，并含有丰富且完整的神经-血管网络。骨外膜具有较强的再生修复能力，临床上骨外膜缺损将导致其被覆的皮质骨缺血坏死，以及无法愈合的骨缺损[27]。在同种异体移植中，骨外膜移植可显著促进骨折修复，并促进大段骨不连的再生。骨外膜主要分为两层，外层的纤维层与内层的生发层。纤维层主要由具有高度方向性和组织性的胶原纤维组成，富含血管、交感神经簇，并有大量的干细胞与内皮细胞；生发层较薄，是成骨细胞、成纤维细胞和破骨前体细胞等的聚集地，当皮质骨需要塑建时，纤维层储存的干细胞逐渐被募集到皮质骨表面，参与成骨分化[25]。骨髓间充质来源干细胞是组织工程中常用的种子细胞，但从骨髓中分离并应用 MSCs 具有潜在的风险和难度。近年来，从多种宿主来源的骨外膜组织中分离培养骨外膜来源干细胞 (periosteum derived stem cells, PDCs) 用于骨组织工程正逐渐成为热点。然而，PDCs 的鉴定及其表面标志物尚不明确，且在皮质骨形成与再生过程中，其体内作用机制与调控机理仍需阐明。重要的是，PDCs 的表面标志物在青春期及成年期是否相同？PDCs 与 MSCs 相比，其自我更新及多向分化潜能是否更佳？因此，PDCs 的鉴定及其在皮质骨形成与再生中的参与机制成为了目前的研究热点与难点。

本研究中，我们首先在显微镜下分离小鼠骨外膜，通过流式细胞学技术筛选出 Nestin⁺PDGFRa⁺CD45⁻Ter119⁻CD31⁻细胞和 LepR⁺CD45⁻Ter119⁻CD31⁻细胞，并验证其自我更新以及多向分化潜能；同时，通过流式细胞学技术筛选出 MSCs，并与 PDCs 进行横向对比。前期研究发现，骨外膜 Trap⁺细胞可募集 PDCs 从而促进皮质骨生长。本实验中，我们进一步通过构建 CSF-1 KO 小鼠，Trap-cre; iDTR 小鼠，Trap-cre; Pdgfr^{fl/fl} 小鼠，CTSK KO 小鼠，Nestin-creER; Pdgfr^{fl/fl} 小鼠和 LepR-cre; Pdgfr^{fl/fl} 小

鼠进行免疫荧光染色、显微 CT 测定和钙黄绿色双标检测，对 Trap⁺细胞功能缺失所致的皮质骨形成障碍模型中 PDCs 的分布与功能进行探讨；并通过在模式动物基础上构建皮质骨损伤模型，观察其在生理性骨生长与病理性骨再生中的作用机理。

1 材料

1.1 仪器设备

半干电转仪	美国 Bio-Rad 公司
视体显微镜	Olympus, Japan
BX-60 型荧光显微镜	Olympus, Japan
超净工作台	苏州净化仪器设备厂
冰冻切片机	Norderstedt, Germany
流式细胞检测仪	Becton Dickinson, USA
凝胶电泳仪	美国 Bio-Rad 公司
CO2 培养箱	日本 Nikon 公司
Chamber Slide	Thermo, Germany
血氧分析仪	空军军医大学第一附属医院

1.2 实验动物与试剂

Csf1 ^{-/-} 小鼠（雄性）	Jackson laboratory, USA
Trap-Cre 小鼠（雄性）	Virginia Commonwealth University, USA
B6-iDTR 小鼠（雄性）	Jackson laboratory, USA
Pdgfb ^{lox/lox} 小鼠（雄性）	Jackson laboratory, USA
Nestin-Cre ^{ERT2} 小鼠（雄性）	Jackson laboratory, USA
LepR-Cre 小鼠（雄性）	Jackson laboratory, USA
Pdgfrβ ^{lox/lox} 小鼠（雄性）	Jackson laboratory, USA
Nestin-GFP 小鼠（雄性）	Cold Spring Harbor, NY, USA
Ctsk ^{-/-} 小鼠（雄性）	Merck Research Laboratories, USA
R26R-EYFP mice	Jackson laboratory, USA
α-MEM 培养基	Gibco, USA

PDGF-BB	Sigma-Aldrich, USA
胎牛血清	Gibco, USA
青链霉素	Sigma-Aldrich, USA
EDTA-胰蛋白酶	Gibco, USA
Transwell 小室	Corning, USA
II 型胶原酶	Gibco, USA
PVDF 膜	Gibco, USA
SYBR PrimeScript™ RT-PCR kit	日本 Takara 公司
ALP 活力试剂盒	美国 Genmed 公司
茜素红 S	Sigma, USA
TRAcP 染色试剂盒	Sigma, USA

2 方法

2.1 骨外膜来源干细胞的提取

常规使用异氟烷对小鼠行吸入麻醉，使用 1ml 肝素预处理注射器从右心房抽取小鼠血液，然后通过左心尖穿刺给予小鼠 PBS 与多聚甲醛以充分灌注并固定。分离小鼠股骨与胫骨，通过显微镜仔细去除附着的肌肉与血管残端，并充分冲洗骨髓腔以去除骨髓来源细胞。剥离骨膜于培养皿中，并在 37°C 条件下用 II 型胶原酶消化 30 分钟，随后将消化后组织与细胞通过 40- μ m 滤网，提取骨膜来源细胞，进行流式细胞学筛选并提纯。

2.2 骨外膜来源干细胞的鉴定

2.2.1 流式细胞学检测

- 1) 将 2.1 所提取的骨外膜来源细胞，滴入红细胞裂解液，作用 10min，并在 4°C 低温下利用高速离心机以 1200r 离心 5min;
- 2) 用流式专用缓冲液重悬细胞，并在 4°C 低温下将细胞洗涤三次，每次 5min;
- 3) 首先给予细胞加入 APC Mouse Anti-Mouse CD45.1 (Bio-Legend, 561873), APC Rat Anti-Mouse CD31 (Bio-Legend, 561814), APC Rat Anti-Mouse TER119 (Bio-Legend, 561033), 并根据分组不同分别加入 PE Rat Anti-Mouse CD140A

(Bio-Legend, 562776), anti-PDGFR β -biotin (eBioscience, clone APB5, 1:200), anti-LepR-biotin (R&D Systems, BAF497), PerCP-conjugated anti-CD105 (Bio-Legend, 120415) and anti-Mouse CD90.2 (Bio-Legend, 105304), 在 4℃ 下孵育 30min,并用洗涤液洗涤三次,每次 5min;

- 4) 通过 5-laser BD FACS 和 FACSDiva 将细胞上机,分别筛选出 Nestin⁺PDGFR α ⁺CD45⁻Ter119⁻CD31⁻细胞和 LepR⁺CD45⁻Ter119⁻CD31⁻细胞,验证其自我更新以及多向分化潜能,并验证其与其他干细胞表面标志物之间的相关性;通过 FACSCalibur flow cytometer、CellQuest software 和 Flowjo 分析流式细胞学检测结果。

2.2.2 骨外膜来源干细胞三系分化功能测定

- 1) 成骨分化:取 2.2.1 筛选细胞,接种于细胞培养六孔板中进行常规细胞培养(10⁵ 个细胞/每孔),待细胞增殖直至铺满孔板底面 70%左右后,使用成骨分化培养基(100nM 地塞米松、50 μ M L-抗坏血酸、100mM β 甘油磷酸钠溶于 10%高糖 DMEM 培养基中),进行 21 天成骨分化诱导;
- 2) 成脂分化:取 2.2.1 筛选细胞,接种于六孔板中进行常规细胞培养(10⁵ 个细胞/每孔),待细胞增殖直至铺满孔板底面 70%左右后,使用成脂分化培养基(10 mM 地塞米松,5 mg/ml 胰岛素, and 0.5 mM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤溶于 10%高糖 DMEM 培养基中),进行 14 天成脂分化诱导;
- 3) 成软骨分化:取 2.2.1 筛选细胞,并以 10⁵ 个细胞密度接种于聚丙烯小管中,使用成软骨诱导培养(0.1 mM 地塞米松,1% insulin-transferrin-sodium selenite mix, 50 mM 抗坏血酸,1mM 丙酮酸钠,50 μ g ml⁻¹ 脯氨酸 and 20 ng ml⁻¹ TGF- β 3 溶于 10%高糖 DMEM 培养基中),进行 21 天成软骨分化诱导。

2.2.3 骨外膜来源干细胞体内与体外自我更新功能测定

- 1) 体外自我更新能力检测:取 2.2.1 筛选细胞,并以 10 cells/cm² 的密度接种于六孔板中,三小时后移去悬浮细胞,给予青链霉素、谷氨酰胺以及 20%胎牛血清;培养 10 天后给予结晶紫染色,测定其体外单克隆形成能力。
- 2) 体内自我更新能力检测:国际上认可的干细胞体内自我更新能力检测主要依赖

于干细胞在连续体内移植实验中，是否仍可保留其“干性”，并维持其微环境的稳定。具体如下：取 2.2.1 筛选细胞，并以 10^6 cells/mice 随机打入 5 只免疫缺陷 NOD SCID 小鼠骨髓腔内，在 8 周后通过流式细胞学技术筛选出 GFP⁺ 的细胞，并通过 1) 中的方法，将筛选细胞诱导形成克隆球，并进行流式细胞学检测其 CD90、CD105 的表达情况；取同样形成克隆球但未进行流式细胞学检测的细胞，以 10^6 cells/mice 再次随机打入 5 只免疫缺陷 NOD SCID 小鼠骨髓腔内，8 周后通过流式细胞学技术，重复上述过程，经过两轮后，取最终筛选的 GFP⁺ 的细胞，进行 CD90、CD105 检测，观察干细胞在体内连续移植实验中，“干性”能否维持。

2.3 显微 CT 分析

2.3.1 取材

将 2.1 中所处理小鼠股骨与胫骨，充分剥离筋膜及肌肉组织，用无菌纱布包裹并固定，根据分组不同分别给予标记。在 4℃ 下用 4% Paraformaldehyde (PFA) 固定 4 小时，然后用 PBS 将残余多聚甲醛洗去，共三遍，每遍 10 分钟，最后一遍在 4℃ 下洗过夜；如需显微 CT 扫描，将标本制作固定模块，在待扫描标本准备完毕后，按显微 CT 的扫描要求进行操作。

2.3.2 显微 CT 分析

将 2.3.1 中所处理样本，通过 micro CT 分析不同基因小鼠皮质骨与松质骨组织的微观结构变化。扫描的参数为：扫描电压为 49KV，扫描为电流 0.2mA，分辨率 8.7 μ m。沿着扫描长骨的长轴方向逐层扫描，利用 Skyscan 软件对扫描后结果进行分析。通过重建软件 (NRecon v1.6)、分析软件 (CTAn v1.9)、三维重建软件 (μ CTVol v2.0) 选取胫骨骨干皮质骨与干骺端松质骨部分作为感兴趣区域 (ROI)。松质骨感兴趣区从生长板下 1mm 处延伸 0.7mm，包含 120 个层面；皮质骨感兴趣区包含胫骨干中段 0.24mm，共含 60 个层面；测量感兴趣区域内所有骨相关参数：皮质骨厚度 (Ct.Th) 以及骨膜周长 (Ps.Pm)、体积分数 (BV/TV)、松质骨厚度 (Tb.Th) 等。在显微 CT 取材分析过程中，严格遵循双盲原则。

2.4 免疫荧光染色检测

将 2.1 中所得标本, 给予 4%多聚甲醛固定 4 小时、10% EDTA 脱钙 3 天、阿拉伯胶脱水 1 天后将组织用 OCT 包埋, 通过冰冻切片机切取 10 μm 厚度进行免疫荧光检测。PBS 孵育 10 分钟进行水化; 然后用免疫组化笔画圈, 防止染色液体渗漏; 随后用 PBS 洗三遍, 5 min \times 3 次。小心轻柔弃去 PBS 后, 滴加 Triton X-100, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中 15 min, 然后再用 PBS 洗三遍, 5 min \times 3 次。用二抗特异性来源种属封闭液封闭样本 1 小时, 然后用抗体稀释液根据不同的抗体进行稀释, 孵育 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日取出后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中复温 1 h, 并用 PBS 洗三遍, 5 min \times 3 次。用抗体稀释液根据不同种属不同类别, 稀释二抗。每个样本中加入 250 μl 稀释后二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱避光孵育标本 1 h, 然后用 PBS 洗三遍, 5 min \times 3 次。轻轻吸去玻片上液体后, 滴入 100 μl 含 DAPI 的封片液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。在 Zeiss LSM780 激光共聚焦显微镜下通过特定选区内选取每个标本随机视野, 并在镜下区域计数阳性细胞并统计。

2.5 TRAcP 染色

将 2.1 中所得标本, 给予 4%多聚甲醛固定 4 小时、10% EDTA 脱钙 7 天、含阿拉伯胶脱水液脱水 1 天后将组织用石蜡包埋, 通过石蜡切片机切取 4 μm 厚度进行免疫组织化学检测。具体如下: 首先将去离子水 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热备用; 从 Sigma 试剂盒中将 50 μl Fast Garnet GBC Base Solution 与 50 μl Sodium Nitrite Solution 混匀 30 s, 并静置 2 min 待其充分混匀; 取 15ml 离心管并配置 TRAcP 染色液 (450 μl 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热去离子水、100 μl GBC 混合液、50 μl Naphthol AS-BI phosphate、200 μl Acetate solution、100 μl 酒石酸盐溶液), 并提前预热至 37 $^{\circ}\text{C}$; 将样本至于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱里避光孵育 TRAcP 染色液 1h; 1h 后去离子水冲洗, fast green 复染 30 s; 晾干、梯度脱水、树胶封片、镜下观察阳性细胞并计数统计。

2.6 小鼠胫骨皮质骨骨损伤模型的构建

将 Trap-Cre;Pdgfb^{f/f} 小鼠与 LepR-Cre;Pdgfr β ^{f/f} 小鼠与相应对照组小鼠各 5 只, 腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后, 固定于小鼠手术操作台上, 充分消毒并将右侧胫骨备皮, 切开右侧胫骨前内侧皮肤(0.5 cm), 钝性分离并暴露至胫骨前内侧骨膜后, 用外径 0.7 mm 注射用针于右侧胫骨前内侧中段钻孔, 打穿皮质骨外侧但不穿透皮质骨内侧, 并且不损伤对侧皮质骨, 术后复位组织、缝合皮肤并腹腔常规注射抗生素两天。

2.7 统计学分析

所得数据利用 SPSS19.0 软件进行统计学单因素方差分析(one-way ANOVA)进行组间比较,以 Bonferroni 进行两两互相比,统计数据呈现为均数 \pm 标准差($\bar{X} \pm SD$), $p < 0.05$ 为具有显著统计学差异。

3 结果

3.1 骨外膜的双层结构与骨外膜来源干细胞(PDCs)的分布

骨外膜分为两层,位于外侧的纤维层(FL, fibrous layer)与贴近皮质骨表面的生发层(CL, cambium layer)。如图 1-1. A-C 所示, Trap⁺细胞全部位于皮质骨表面,在小鼠出生后早期及青春期数量较多,且随着成熟期逐渐减少。有趣的是,骨膜生发层大量分布着促进细胞成骨分化与细胞黏附的骨膜素(periostin)以及显著促进骨形成的 H 型血管(CD31^{hi}Emcn^{hi}) (图 1-1. D-E),为骨外膜干细胞提供成骨微环境,并维持皮质骨生长。当小鼠从成熟期逐渐衰老过程中,生发层的骨膜素大幅度降低、H 型血管减少、骨外膜厚度降低且细胞数目减少(图 1-1. F)。我们首次发现骨外膜 Nestin⁺ PDCs 在青春期、LepR⁺ PDCs 在成年期大量分布于骨外膜外层,且逐渐向皮质骨表面迁移。在骨发育成熟晚期,骨外膜 Nestin⁺ PDCs 逐渐减少,伴随 LepR⁺ PDCs 增多,提示骨外膜含有两群干细胞,且具有时空依赖性。

3.2 骨外膜来源干细胞的鉴定

已有学者证实骨髓腔中 Nestin⁺细胞与 LepR⁺细胞为骨髓间充质干细胞,具有多向分化潜能。骨外膜中含有大量的干/祖细胞,为潜在的骨再生种子细胞库。然而,骨外膜干细胞的来源与表面标志尚未阐明。本研究率先运用流式细胞学技术,通过使用不同年龄阶段的 Nestin-GFP 小鼠与 LepR-cre;R26R;EYFP 小鼠,筛选出骨外膜中的 Nestin⁺细胞与 LepR⁺细胞,并剔除掉 CD31⁺Ter119⁺CD45⁺的内皮细胞、巨噬细胞以及红系细胞。我们发现: Nestin⁺CD31⁻Ter119⁻CD45⁻细胞与 LepR⁺CD31⁻Ter119⁻CD45⁻细胞高表达 MSCs marker PDGFR α 与 PDGFR β ,且 PDGFR α ⁺细胞同样高表达 LepR⁺,提示其几乎为同一群落细胞(图 1-2. A-D)。有趣的是,仅有 40%的 PDGFR α ⁺细胞表达 Nestin⁺GFP,证实了 Nestin⁺细胞的 heterogeneity 且具有多个 subpopulation。并

且青春期与成熟期的 Nestin⁺CD31⁻Ter119⁻CD45⁻细胞的 LepR 均表达极少,证实 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 为两群不同的骨外膜来源干细胞(图 1-2. A-D)。有研究表明,Nestin⁺细胞可能包含 Nestin⁺PDGFRa⁺双阳性的干/祖细胞和 Nestin⁺PDGFRa⁻的血旺细胞前体。为了进一步提纯骨外膜 Nestin⁺PDCs,我们在 Nestin⁺CD31⁻Ter119⁻CD45⁻细胞基础上进一步 cross 了 PDGFRa⁺细胞,结果显示 Nestin⁺PDGFRa⁺CD31⁻Ter119⁻CD45⁻细胞高度表达 MSCs marker CD90 与 CD105,提示了其潜在的干细胞特性(图 1-2. E)。然而,LepR⁺CD31⁻Ter119⁻CD45⁻细胞与 CD105⁺细胞 cross 后,并不能显著提升 LepR⁺ PDCs 的干细胞表面标志物 CD90 的表达,揭示 LepR⁺ PDCs 这一 population 中干细胞的纯度很高(图 1-2. F-H)。为了进一步明确此发现,我们通过流式细胞学技术筛选出 PDGFRa⁺CD31⁻Ter119⁻CD45⁻细胞、Nestin⁺PDGFRa⁺CD31⁻Ter119⁻CD45⁻细胞、Nestin⁺PDGFRa⁻CD31⁻Ter119⁻CD45⁻细胞、LepR⁺CD31⁻Ter119⁻CD45⁻细胞、LepR⁺CD105⁺CD31⁻Ter119⁻CD45⁻细胞、LepR⁺CD105⁻CD31⁻Ter119⁻CD45⁻细胞,并用 CD31⁻Ter119⁻CD45⁻细胞作为对照组,进行体外 CFU-F 形成实验,比较各个 lineage 之间自我更新潜能。结果显示骨外膜 Nestin⁺PDGFRa⁺CD31⁻Ter119⁻CD45⁻细胞、LepR⁺CD31⁻Ter119⁻CD45⁻细胞与 LepR⁺CD105⁺CD31⁻Ter119⁻CD45⁻细胞的集落形成能力最强,且上述三群细胞间的自我更新潜能无显著差异,进一步验证了 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 的纯度与干性(图 1-2. J)。

为了进一步验证 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 在体内的自我更新能力,我们使用了 NOD-SCID 免疫缺陷小鼠进行干细胞连续移植试验(serial transplantation assay),实验方法如图所示,通过流式细胞学技术筛选出 Nestin⁺PDGFRa⁺CD31⁻Ter119⁻CD45⁻细胞与 LepR⁺CD31⁻Ter119⁻CD45⁻细胞,以 10⁶个细胞注射到受体免疫缺陷小鼠的骨髓腔中,经过八周的时间后,通过流式细胞学筛选出 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs,并在体外进行单克隆扩增,将扩增后的细胞再次移植到免疫缺陷小鼠骨髓腔中,连续两轮后,我们发现流式细胞学技术筛选出的 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs,仍高度表达 MSCs marker CD90 和 CD105,提示这两群细胞在体内强大的自我更新潜能(图 1-3. A-B)。

为了探究 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 在体内的转归与命运,我们通过 Nestin-Cre^{ER};R26R;EYFP 和 LepR-Cre;R26R;EYFP 小鼠对不同阶段的 Nestin⁺ PDCs

与 LepR⁺ PDCs 进行了示踪, 通过在不同时间点注射 tamoxifen, 我们发现 Nestin⁺ PDCs 在青春期逐渐从骨外膜外层向皮质骨表面迁移, 并向 Osx⁺成骨前体细胞分化; 而在成年期, Nestin⁺ PDCs 大量向 CD31⁺血管内皮细胞转化, 却不能向成骨 lineage 转化, 提示 Nestin⁺ PDCs 的 heterogeneity (图 1-3. C-F)。有趣的是, LepR⁺ PDCs 在青春期数量很少且几乎无成骨分化能力, 而在成年期大量向 Osx⁺成骨前体细胞转归, 且作为血管周细胞参与小鼠成年期皮质骨的形成(图 1-3. G-H)。

研究表明, “干细胞”除了具有自我更新潜能外, 还具有多向分化能力。为了阐明 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 是否具有多向分化潜能, 我们通过流式细胞学技术, 将筛选出的 PDCs 分别进行体外 CFU-F, 成骨、成脂以及成软骨分化诱导, 并将骨髓来源的 Nestin⁺ MSCs 与 LepR⁺ MSCs 作为对照组。集落刺激实验及染色结果显示, Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 具有集落形成能力(图 1-4. A-B), 且可向成骨细胞、软骨细胞以及脂肪细胞分化(图 1-4. C-E)。有趣的是, 虽然使用同样的细胞 marker, 但骨外膜来源的 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 的成骨分化与成软骨分化能力显著强于骨髓间充质来源的 MSCs (图 1-4. C-H), 提示骨外膜微环境在 PDCs 的自我更新及多向分化能力中发挥着关键性作用。

以上结果表明, Nestin⁺ PDCs 在青春期、LepR⁺ PDC 在成年期大量分布于骨外膜, 且具有较强的自我更新潜能与多向分化能力。

3.3 骨外膜来源干细胞在皮质骨形成中的关键性作用

为了探究骨外膜干细胞在皮质骨形成中的关键性作用, 我们通过在多种皮质骨发育缺陷小鼠中观察 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 的状态与转归。有研究表明, CSF-1 KO 小鼠中, 皮质骨厚度大幅度减少, 且 Trap⁺细胞显著减少。我们首先通过 CSF-1 KO 小鼠, 观察到 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 大量减少, 且伴随有 Trap⁺细胞的消失、骨膜素分泌显著降低(图 1-5. A-C)、成骨细胞显著减少、骨外膜 H 型血管消失、骨外膜的形态结构显著紊乱(图 1-6. A-C)。以上结果提示 macrophage-lineage 包括 Trap⁺细胞对骨外膜干细胞的迁移以及皮质骨形成具有显著调控作用。

我们之前的研究表明, Trap⁺细胞可分泌 PDGF-BB, 促进成骨-成血管偶联, 进而促进皮质骨的形成[210]。为了进一步阐明此发现, 我们分别构建了 Trap-Cre;iDTR

小鼠(Trap⁺细胞特异性清除)、Trap-Cre;Pdgfb^{f/f}小鼠(Trap⁺细胞特异性敲除 PDGF-BB)以及 CTSK KO 小鼠 (Trap⁺细胞分泌 PDGF-BB 增多)。结果显示, Trap-Cre;iDTR 小鼠(图 1-7)与 Trap-Cre;Pdgfb^{f/f}小鼠 (图 1-8)的 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 迁移能力显著受损,并大量聚积在骨外膜外层,皮质骨形成显著受抑制,提示 Trap⁺细胞分泌 PDGF-BB 可调控 PDCs 从骨外膜外层逐渐向皮质骨表面迁移,促进皮质骨的形成与发育(图 1-7, A-H、图 1-8, A-B)。有趣的是,在 CTSK KO 小鼠中, Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 迁移能力显著增强,大量向皮质骨表面募集,导致皮质骨形成显著加强,皮质骨厚度增加,且伴随有显著增强的成骨-成血管偶联,以及骨外膜厚度与细胞数目的增加(图 1-9, A-L)。

为了进一步阐明 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 的迁移与转归在皮质骨形成中的作用机制,我们分别构建了 Nestin-CreER;Pdgfr β 小鼠(Nestin⁺细胞特异性敲除 Pdgfr β)和 LepR-Cre; Pdgfr β 小鼠 (LepR⁺细胞特异性敲除 Pdgfr β) (图 1-10)。结果显示,在青春期的 Nestin⁺ PDCs 中敲除 Pdgfr β 以及在成年期的 LepR⁺ PDCs 中敲除 Pdgfr β 可分别抑制 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 的迁移,导致皮质骨形成能力下调,皮质骨厚度变薄(图 1-10, A-J)。并且, Nestin-CreER;Pdgfr β 小鼠与对照组相比, H 型血管形成能力减弱、骨膜素分泌减少、外膜厚度与细胞数量减弱。同样, LepR-Cre;Pdgfr β 小鼠与对照组相比,皮质骨表面成骨细胞较少、骨膜素分泌减少、外膜细胞数量下降(图 1-11)。不同的是, LepR-Cre; Pdgfr β 小鼠与对照组相比,成年期的 LepR⁺ PDCs 并不能影响 H 型血管的形成以及骨外膜的厚度,提示 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 分别在青春期与成年期调控皮质骨生长、骨膜的稳定、骨膜素的分泌,且功能有所差别(图 1-11)。

此外,我们在 Trap-Cre;Pdgfb^{f/f}小鼠中构建了皮质骨缺损模型,分别在损伤后 2 天、7 天、14 天取材观察皮质骨再生情况与 PDCs 的功能状态。有趣的是, Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 的迁移受阻严重影响了皮质骨的正常修复过程,使得 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 并不能募集到损伤区域进行成骨修饰,进而影响皮质骨的损伤后再生(图 1-12, A-B)。

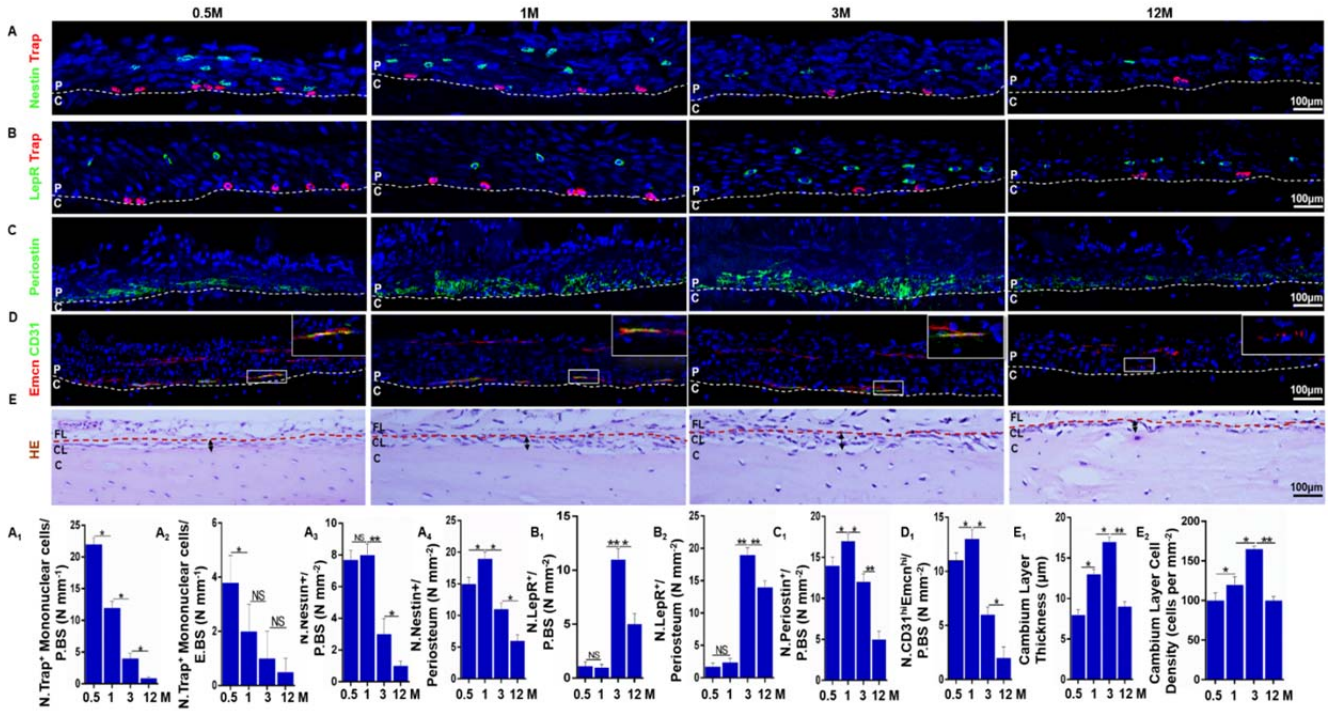


图 1-1 骨外膜的结构与构成

小鼠不同发育阶段（0.5、1、3、12 month）骨外膜的结构与构成情况。（A-D）骨外膜的免疫荧光染色（A, Nestin,Trap; A1,骨外膜 Trap⁺细胞计数; A2, 骨内膜 Trap⁺细胞计数; A3,骨外膜内层 Nestin⁺细胞计数; A4,骨外膜总 Nestin⁺细胞计数）；（B, LepR,Trap; B1,骨外膜内层 LepR⁺细胞计数; B2,骨外膜总 LepR⁺细胞计数）；（C,Periostin;C1,骨外膜 Periostin⁺细胞计数）；（D,Emcn,CD31;D1,骨外膜 CD31⁺Emcn⁺血管计数）。（E）骨外膜的 H&E 染色;(E1,骨外膜内层厚度; E2,骨外膜内层细胞密度)。
**p*<0.05 代表有统计学差异，NS 代表无统计学差异。

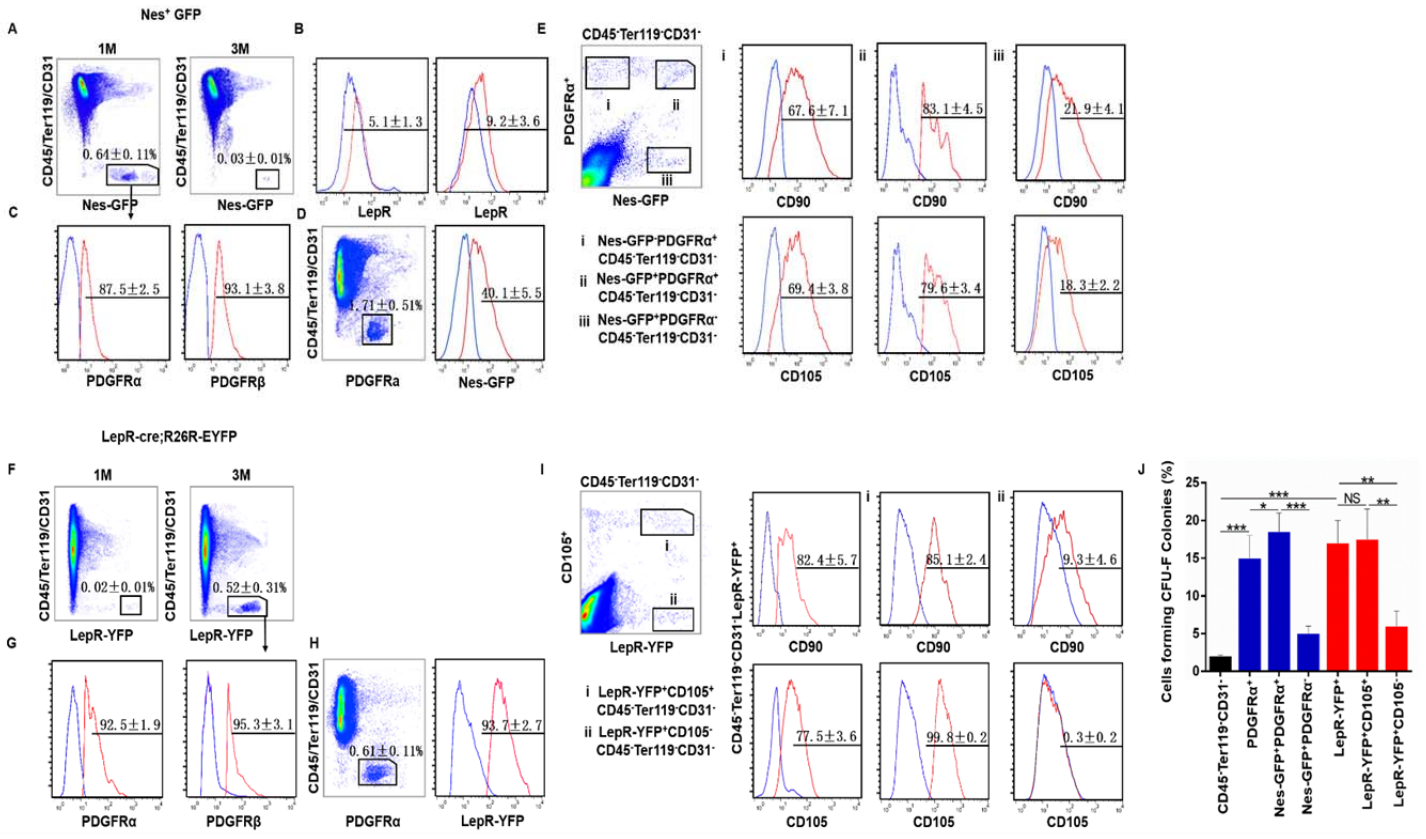


图 1-2 小鼠骨外膜 Nestin⁺与 LepR⁺细胞表达干细胞 markers

小鼠不同发育阶段（1 和 3 月龄）骨外膜 Nestin⁺与 LepR⁺细胞的数量与干细胞特性。(A) 流式细胞学检测 Nestin⁺细胞占骨外膜细胞比例;(B) 流式细胞学检测 Nestin⁺细胞占骨外膜 LepR⁺细胞比例;(C)流式细胞学检测 Nestin⁺细胞占骨外膜 PDGFR α 与 PDGFR β 的比例; (D) 流式细胞学检测 PDGFR α ⁺细胞占骨外膜 Nestin⁺细胞的比例; (E)骨外膜 Nestin⁺PDGFR α ⁺细胞、Nestin⁺PDGFR α ⁻细胞、Nestin⁻PDGFR α ⁺细胞表达干细胞 marker CD90 与 CD105 的情况;(F) 流式细胞学检测 LepR⁺细胞占骨外膜细胞比例;(G) 流式细胞学检测 LepR⁺细胞占骨外膜 PDGFR α 与 PDGFR β 的比例;(H)流式细胞学检测 PDGFR α ⁺细胞占骨外膜 LepR 细胞的比例; (I) 骨外膜 LepR⁺CD105⁺细胞、LepR⁺CD105⁻细胞表达干细胞 marker CD90 与 CD105 的情况;(J) 不同种群骨外膜细胞的集落形成能力。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 代表有统计学差异, NS 代表无统计学差异。

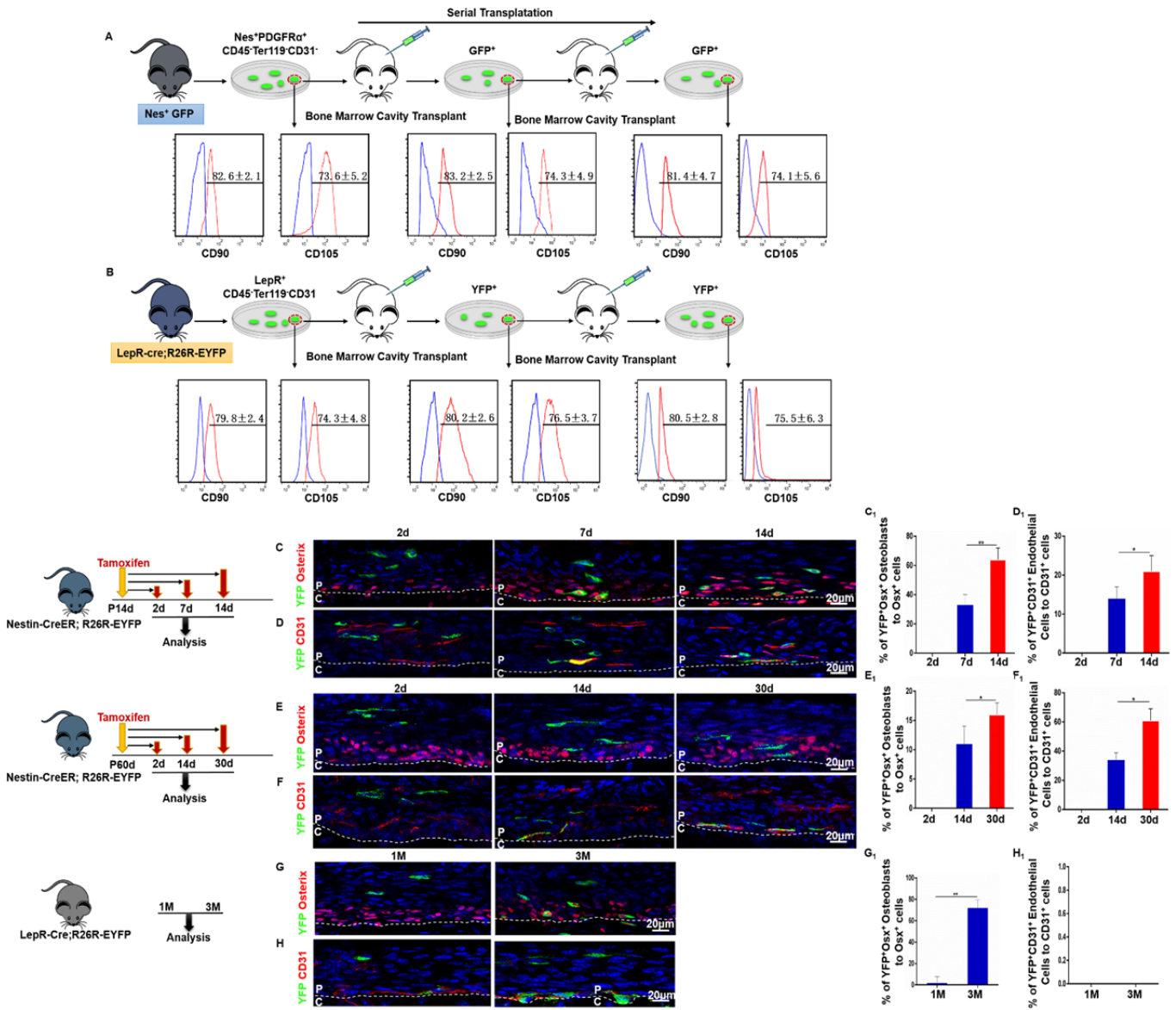


图 1-3 骨外膜干细胞的连续移植实验及体内动态荧光示踪

(A-B) 小鼠骨外膜 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 的体外连续移植试验, 并通过流式细胞学技术体外鉴定其干细胞 marker CD90 与 CD105 的表达情况。(C-F) 1 月龄与 3 月龄 Nes-CreER;R26R-EYFP 小鼠体内示踪, 免疫荧光染色 (Osterix,CD31) 观察其成骨与成血管能力, 并统计; (G-H) 1 月龄与 3 月龄 Nes-CreER;R26R-EYFP 小鼠体内示踪, 免疫荧光染色 (Osterix,CD31) 观察其成骨能力及血管内皮细胞的关系, 并统计。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 代表有统计学差异, NS 代表无统计学差异。

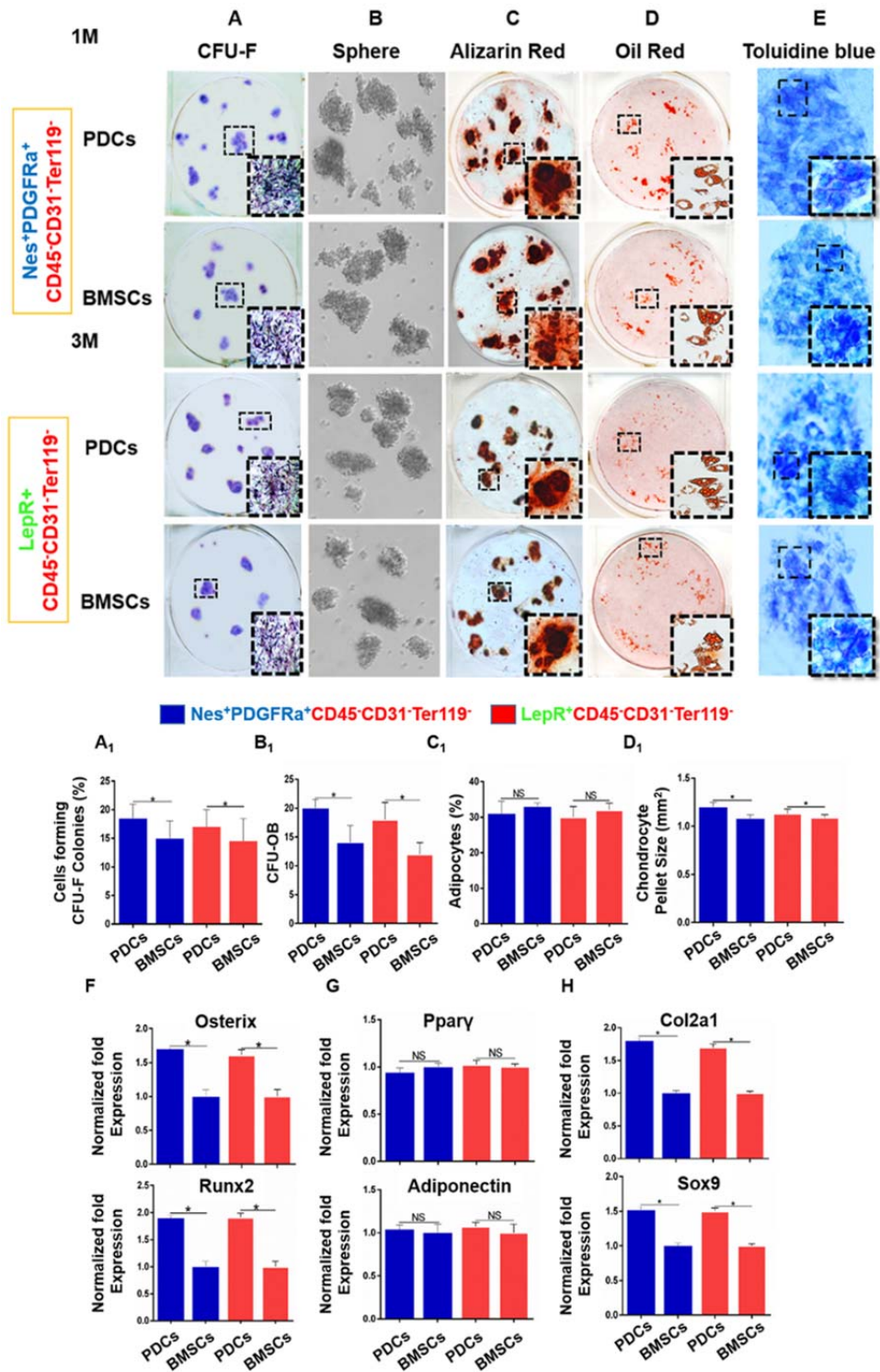


图 1-4 骨外膜干细胞的体外自我更新及三系分化能力

(A-B) 小鼠骨外膜 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 的体外 CFU-F 以及 Sphere 形成试验；(C-E) 小鼠骨外膜 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 的体外茜素红、油红 O 以及甲苯胺蓝染色；(F-H) 小鼠骨外膜 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 的成骨相关、成脂相关以及成软骨相关基因表达情况。**p*<0.05、***p*<0.01、****p*<0.001 代表有统计学差异，NS 代表无统计学差异。

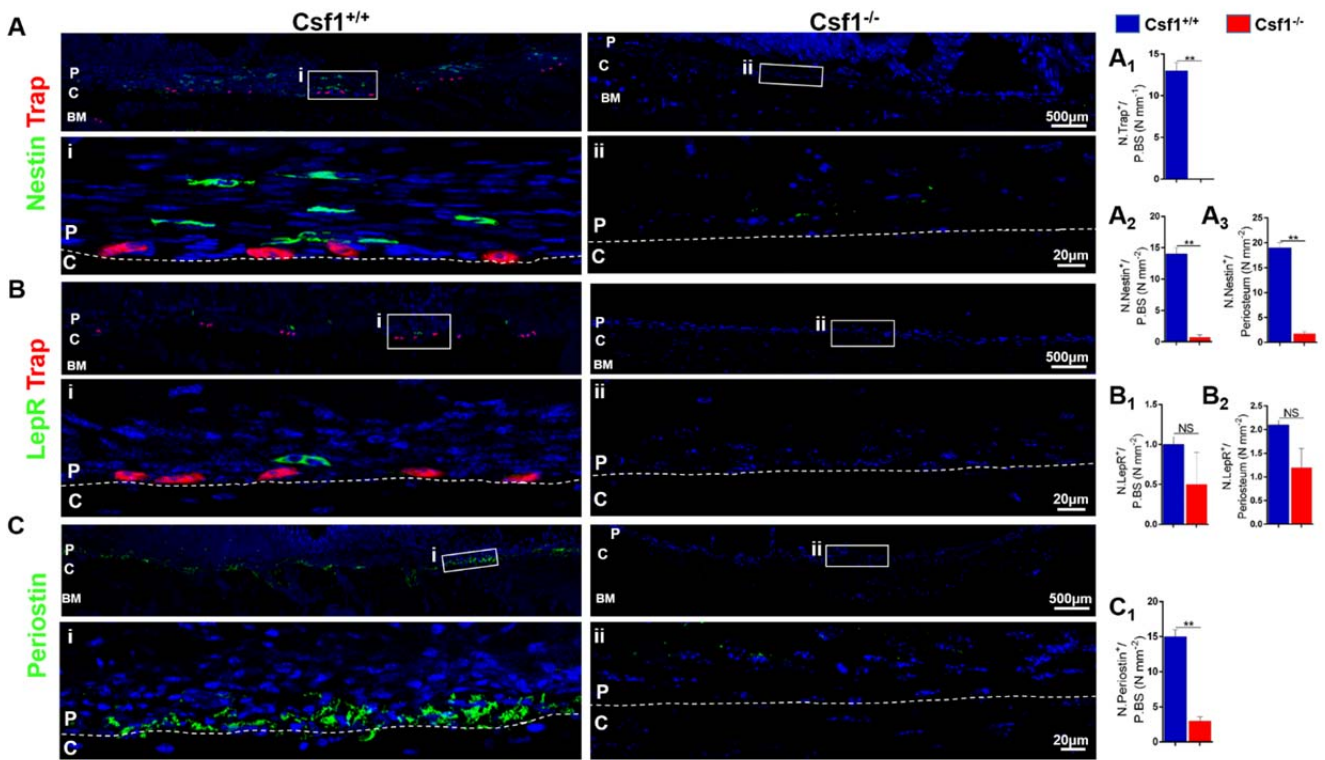


图 1-5 Macrophage-lineage 细胞调控骨外膜干细胞增殖与迁移

(A-C) 骨外膜的免疫荧光染色 (A, Nestin,Trap; B, LepR,Trap; C,Periostin) 及统计; * $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、*** $p<0.001$ 代表有统计学差异, NS 代表无统计学差异。

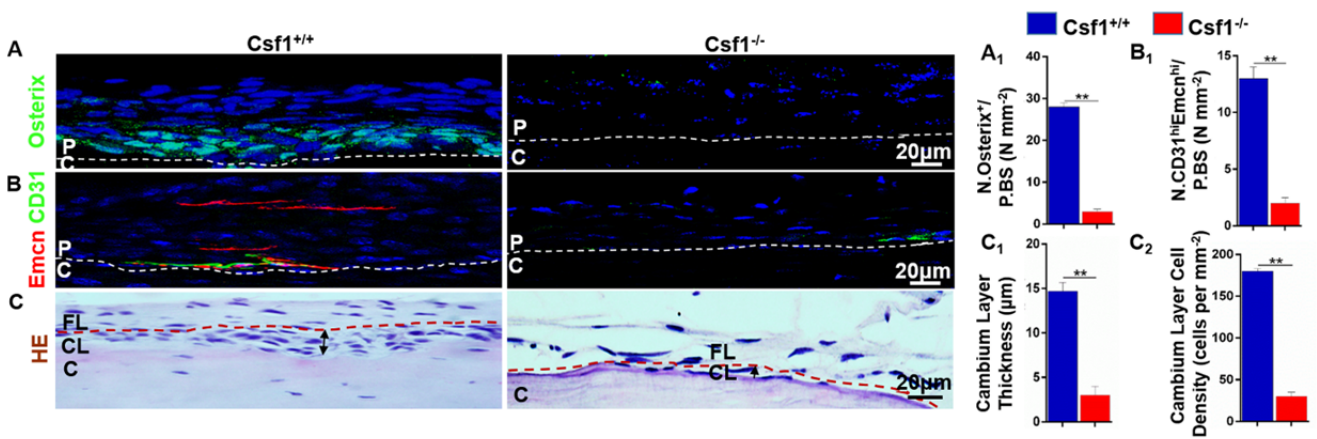


图 1-6 Macrophage-lineage 细胞调控骨外膜的血运及代谢平衡

(A-C) 骨外膜的免疫荧光染色 (A, Osterix; B, Emcn,CD31) 和 H&E 染色及统计; * $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、*** $p<0.001$ 代表有统计学差异, NS 代表无统计学差异。

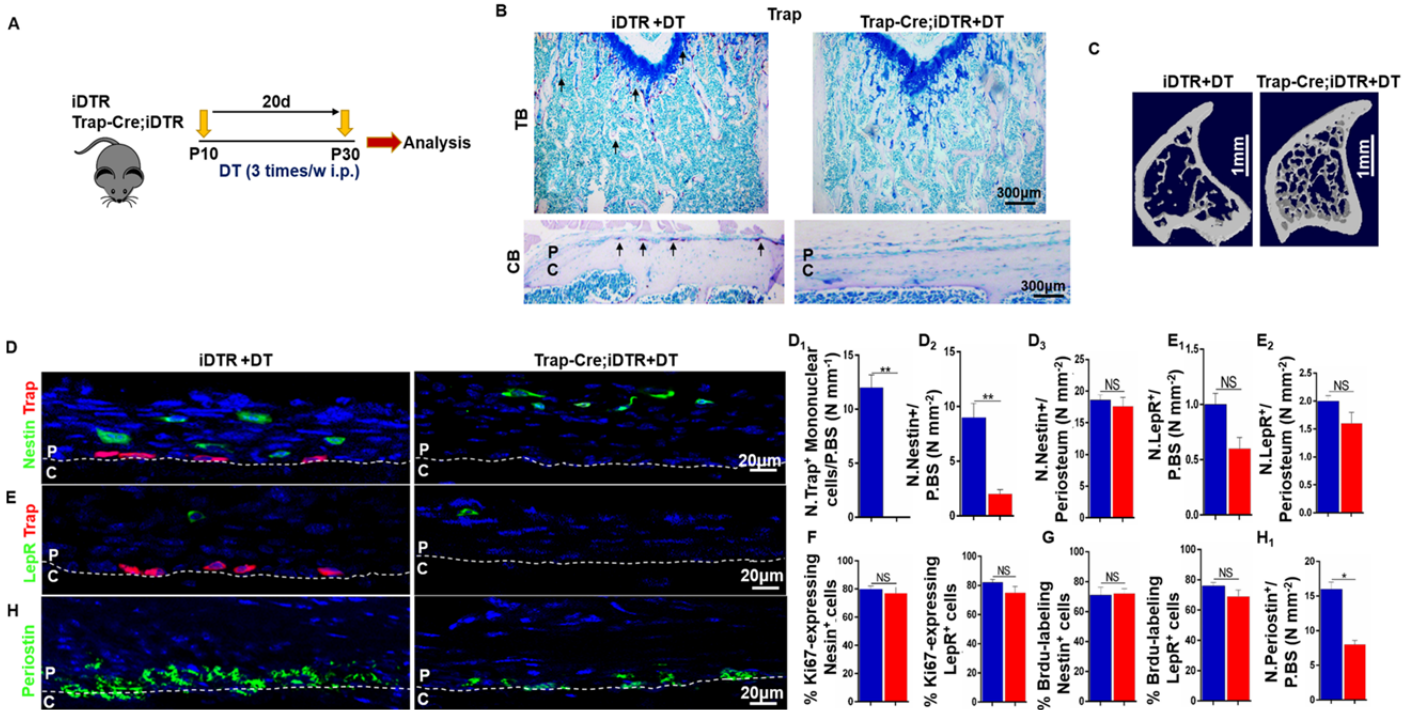


图 1-7 $Trap^+$ 细胞调控骨外膜干细胞的动态迁移

(A) $Trap\text{-}cre;iDTR^{flf}$ 小鼠的构建及给药过程; (B) TRAP 化学染色; (C) Micro CT; (D-H)骨外膜的免疫荧光染色 (D, Nestin,Trap; E, LepR,Trap; F,Ki67;G,BrdU;H,Periostin) 及统计; * $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、*** $p<0.001$ 代表有统计学差异, NS 代表无统计学差异。

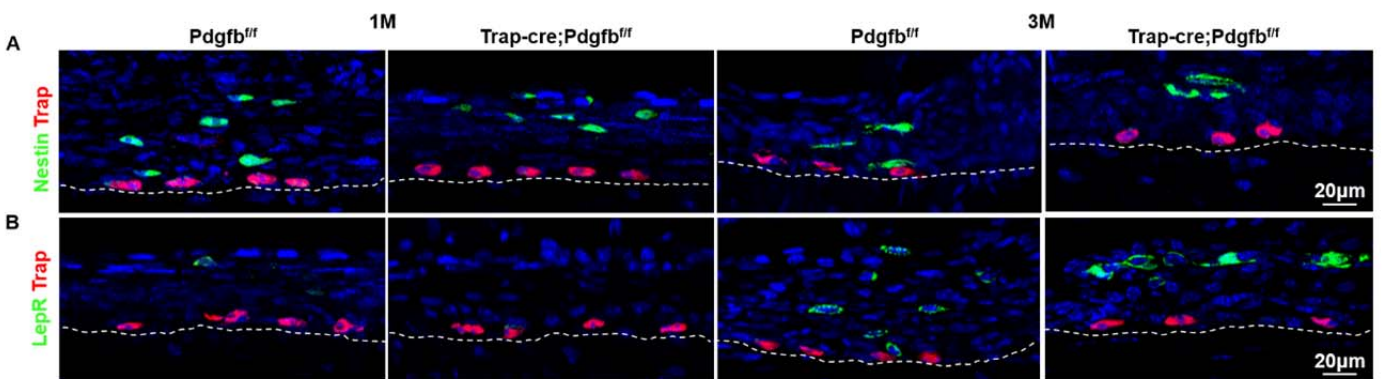


图 1-8 $Trap^+$ 细胞分泌 PDGF-BB 调控骨外膜干细胞迁移

(A-B) 一月龄及三月龄 $Trap\text{-}Cre;Pdgfb^{flf}$ 小鼠骨外膜的免疫荧光染色 (A, Nestin,Trap; B, LepR,Trap;) 及统计; * $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、*** $p<0.001$ 代表有统计学差异, NS 代表无统计学差异。

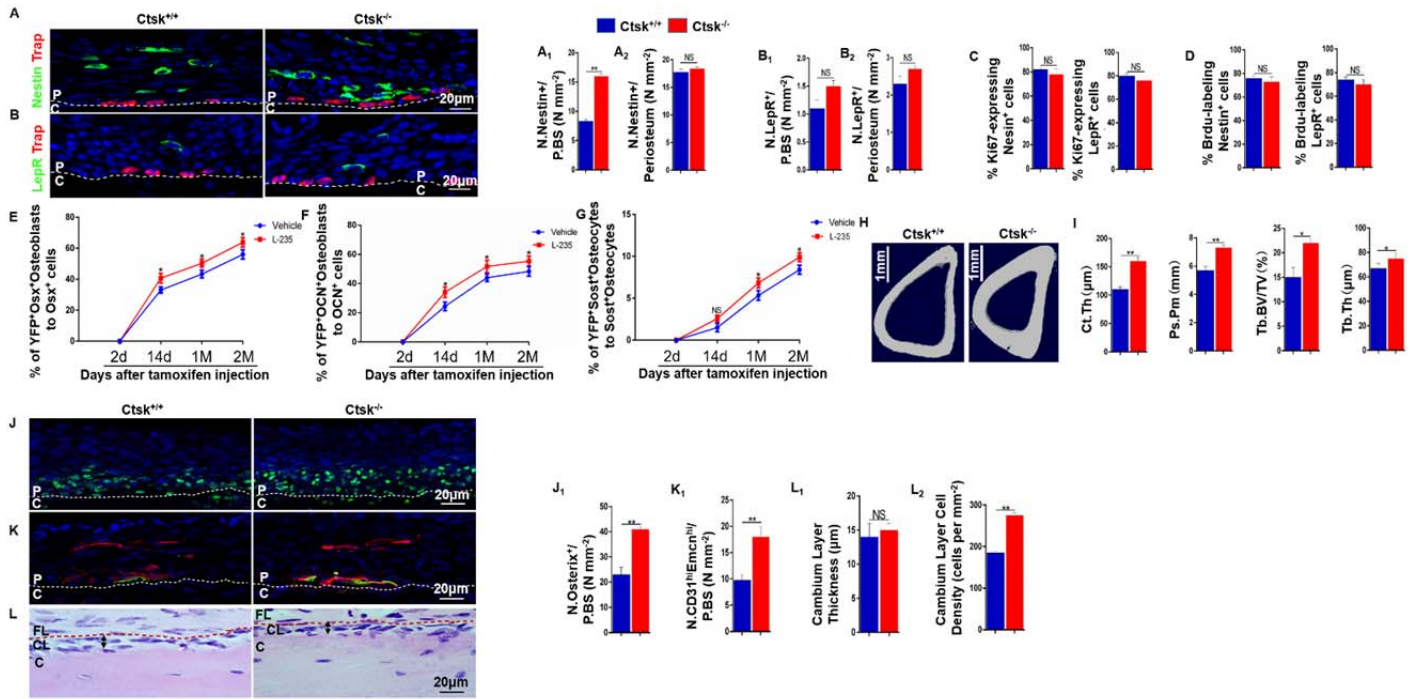


图 1-9 Trap⁺细胞分泌 PDGF-BB 调控骨外膜干细胞迁移, 从而促进皮质骨形成及骨外膜代谢平衡

(A-D) 骨外膜的免疫荧光染色 (A, Nestin, Trap; B, LepR, Trap; C, Ki67; D, BrdU) 及统计; (E-G) 骨外膜干细胞在不同时期对皮质骨形成能力的荧光示踪; (H-I) Micro CT; (J-K) 骨外膜的免疫荧光染色 (J, Osterix; K, CD31, Emcn) 及统计; (L) 骨外膜的 H&E 染色及统计。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 代表有统计学差异, NS 代表无统计学差异。

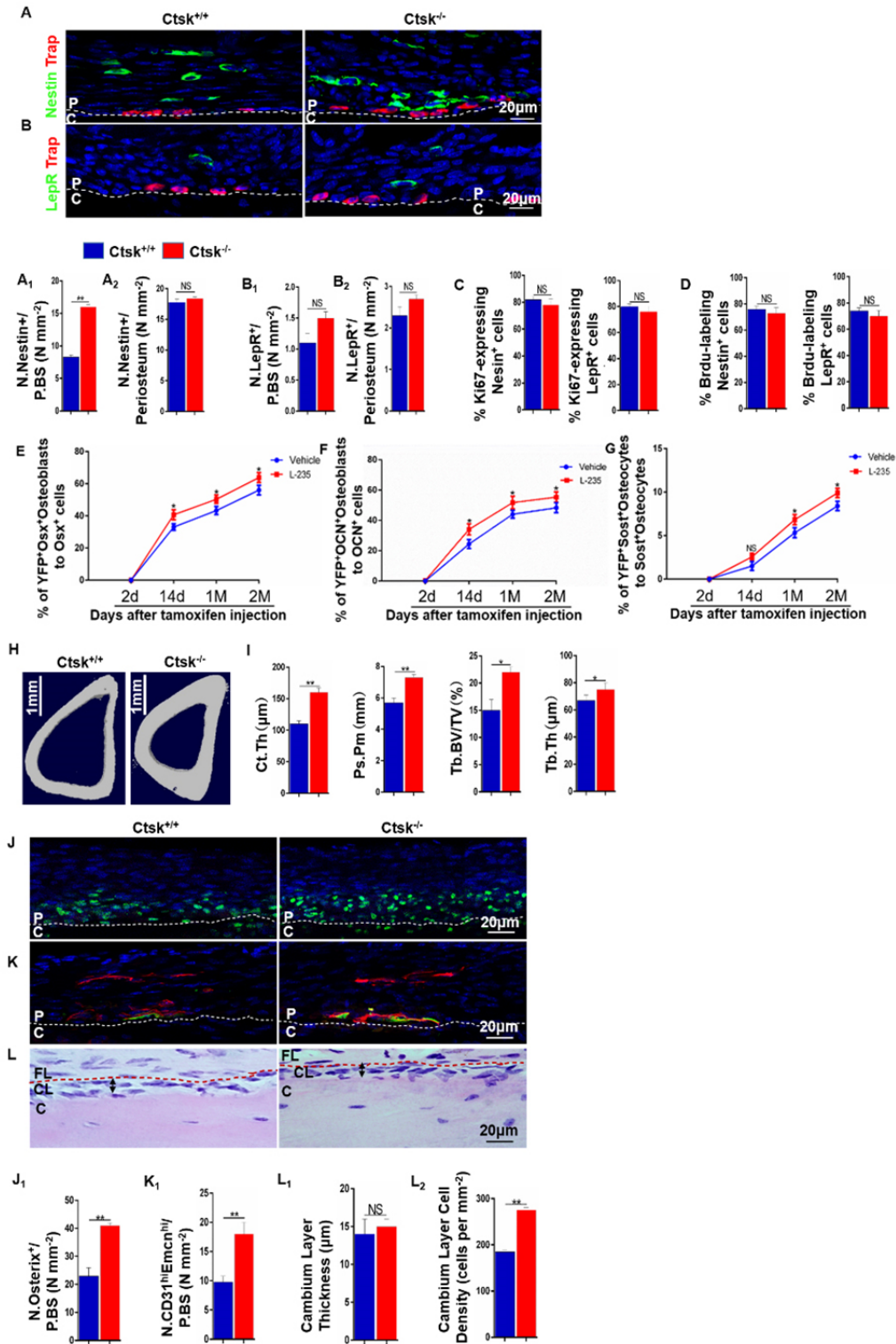


图 1-9 Trap⁺细胞分泌 PDGF-BB 调控骨外膜干细胞迁移,从而促进皮质骨形成及骨外膜代谢平衡 (A-D) 骨外膜的免疫荧光染色 (A, Nestin,Trap; B, LepR,Trap; C,Ki67; D,Brdu) 及统计; (E-G) 骨外膜干细胞在不同时期对皮质骨形成能力的荧光示踪; (H-I) Micro CT; (J-K) 骨外膜的免疫荧光染色 (J, Osterix-Green; K, CD31-Green,Emcn-Red)及统计;(L)骨外膜的 H&E 染色及统计。

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 代表有统计学差异, NS 代表无统计学差异。

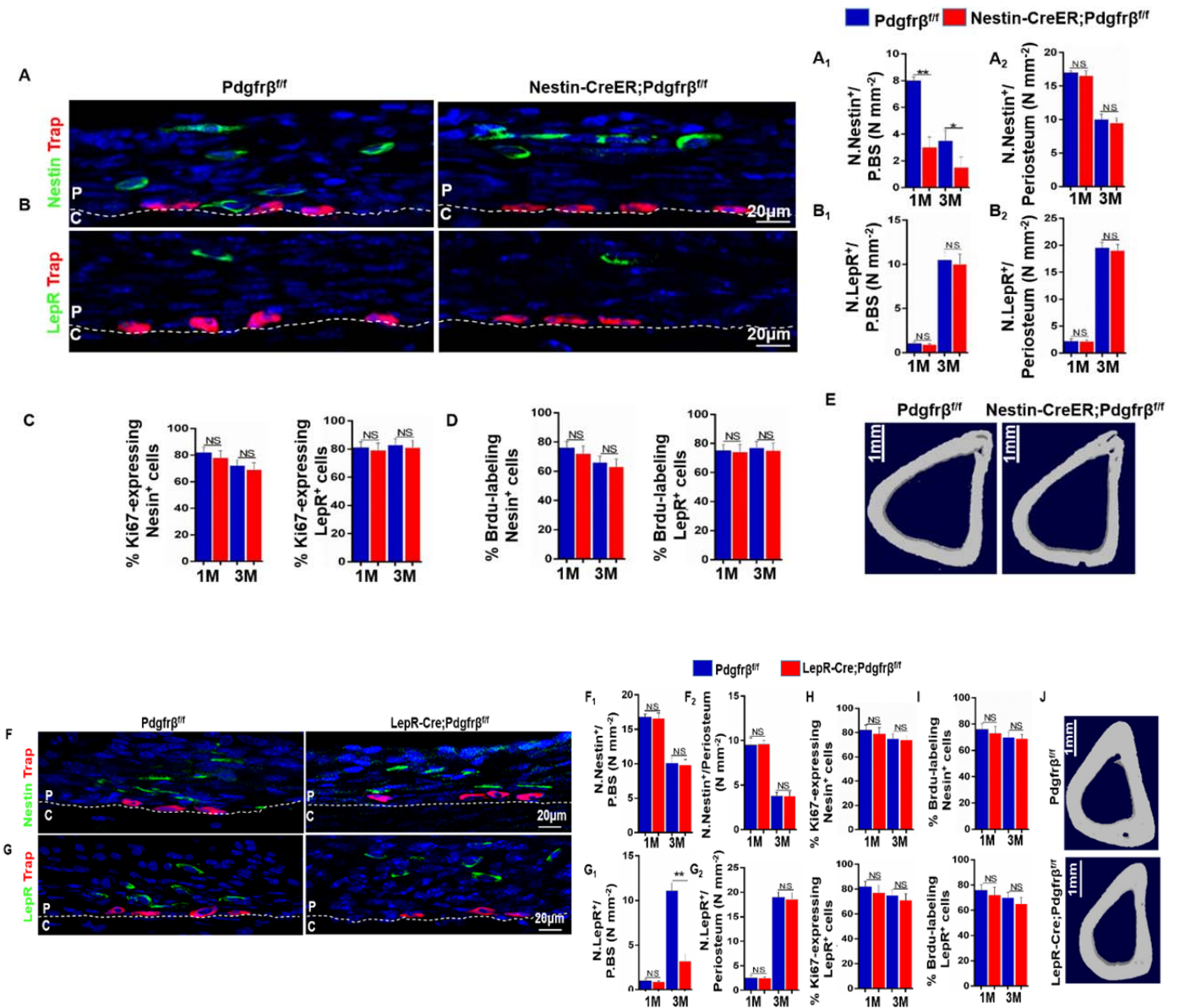


图 1-10 不同种群的骨外膜干细胞分别在青春期及成年期调控皮质骨生长

(A-D) 骨外膜的免疫荧光染色 (A, Nestin,Trap; B, LepR,Trap; C,Ki67; D,Brdu) 及统计; (E) Micro CT; (F-I)骨外膜的免疫荧光染色(F,Nestin,Trap; G, LepR,Trap; H,Ki67;I,Brdu)及统计; (J) Micro CT。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 代表有统计学差异, NS 代表无统计学差异。

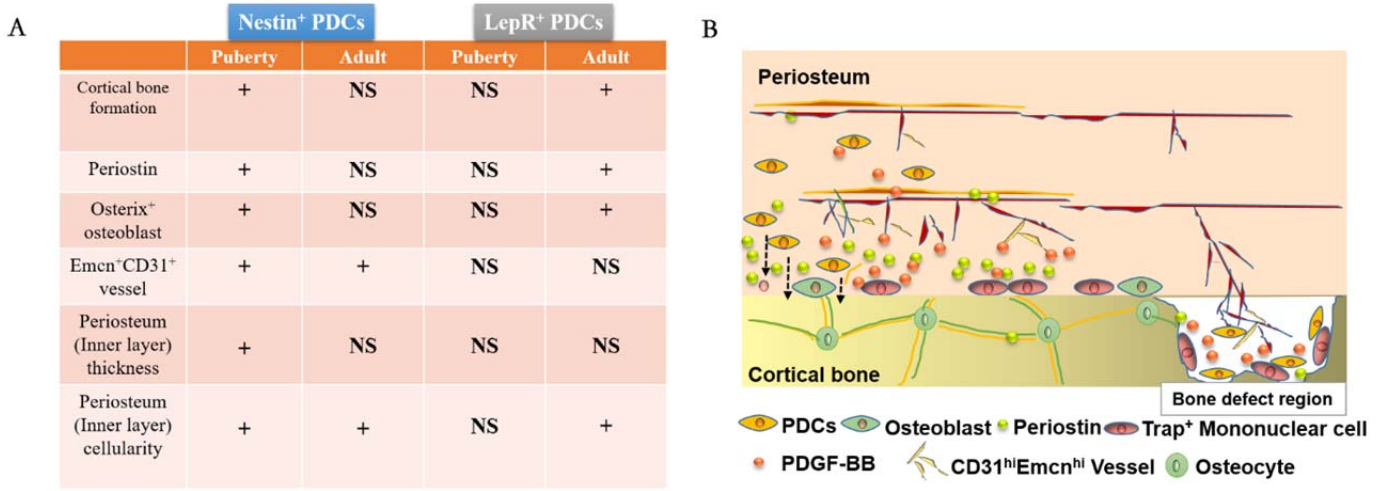


图 1-11 不同种群的骨外膜干细胞分别在青春期及成年期发挥多种生物学功能

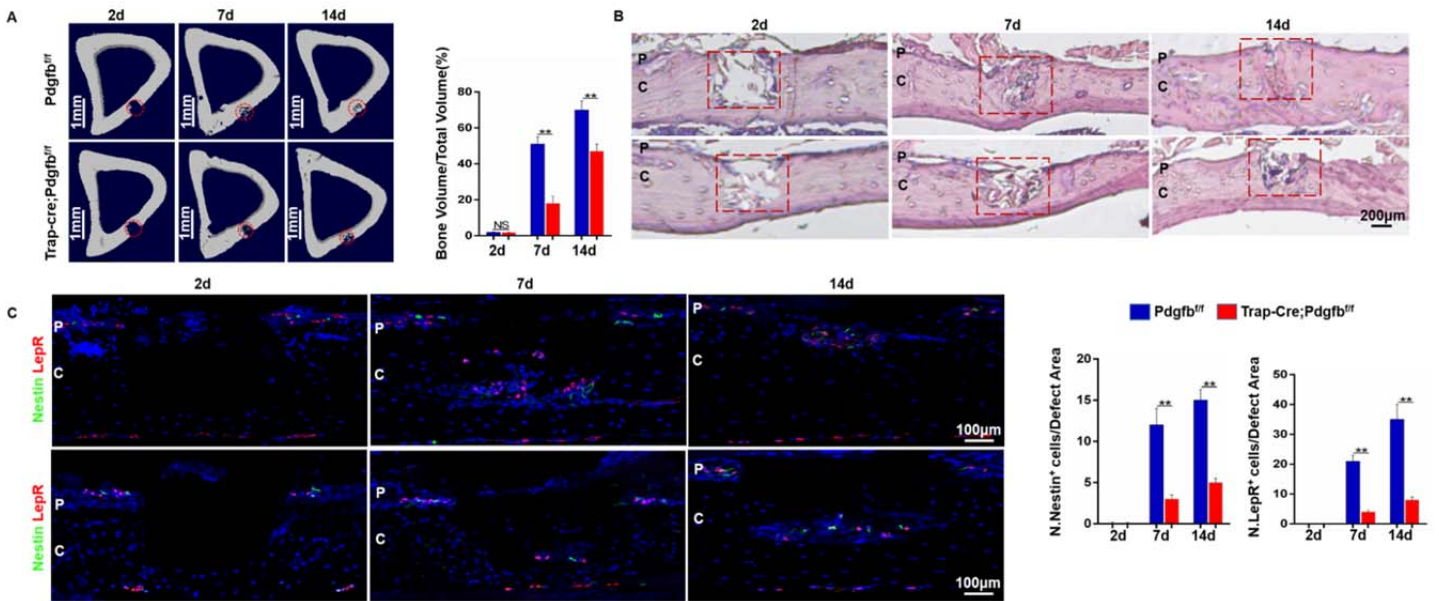


图 1-12 骨外膜干细胞在皮质骨缺损修复过程中的作用

(A) Micro CT; (B) H&E 染色; (C)骨外膜的免疫荧光染色 (Nestin,LepR) 及统计。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 代表有统计学差异，NS 代表无统计学差异。

4 讨论

骨外膜富含大量的血管和神经网络，贴附于除关节外几乎所有的皮质骨表面。骨外膜强大的成骨能力使得损伤后骨缺损得以修复与再生。如果受损伤皮质骨无骨外膜附着，将导致无法避免的骨缺血坏死。骨外膜强大的成骨能力使其成为骨科手术中“垂涎三尺”的法宝。然而，骨外膜的来源有限，获取渠道较少，且获取的量也不多，始终限制着其临床应用前景。近年来有研究表明，髋关节置换手术中，可获取大量的骨外膜组织，且提取后获得的骨外膜来源干细胞，具有强大的促骨形成与骨再生能力[211]。事实上，骨外膜干细胞已有多年的研究历史，众多学者通过多种方式分离骨外膜来源干细胞，希望能找到一个潜在的具有自我更新与多向分化潜能的干细胞群。截至日期，骨外膜来源干细胞的具体功能、分布位置、表面标记物仍未被阐明。所以，本课题通过流式细胞学技术以及多种模式动物，率先发现了骨外膜 Nestin⁺细胞与 LepR⁺细胞具有干细胞特性。并且，我们通过体内与体外实验分别阐明了骨外膜干细胞的生理功能特性以及病理性应答反应。通过与骨髓间充质来源干细胞在自我更新以及多向分化潜能中的对比，揭示了骨外膜具有的独特微环境及其对骨外膜来源干细胞成骨与再生能力的促进作用。

研究表明，从骨外膜中分离提取的细胞具有多向分化功能，并可在一定的条件下在体内移植实验中作为种子细胞参与再生[53]。从形态学上观察，骨外膜分离培养的细胞，与 MSCs 形态类似，有自我更新能力，并且受激素与相关药物调节，提示骨外膜细胞中含有一定数量的干/祖细胞，但干细胞的比例、数量以及具体在骨形成中的功能都不清楚。随着细胞表面标志物研究的突飞猛进，从前传统观点认为的骨髓间充质干/祖细胞根据位置、marker 的类型与表达强度被细分为多种亚群；其中，已被证实具有自我更新及多向分化潜能的有 Nestin⁺ MSCs、LepR⁺ MSCs、Gli1⁺ MSCs、Pdgfra⁺ MSCs、Scal⁺ MSCs、CD146⁺ MSCs、Gli1⁺ MSCs、CD105⁺ MSCs 与 Gremlin1⁺ MSCs 等等，然而骨外膜来源干细胞的表面标志物至今仍不明了。本研究的前期结果发现，骨外膜细胞分别在青春期与成熟期高度表达 Nestin 与 LepR，提示了潜在的干细胞亚群。为了证实此推论，我们通过使用 Nestin-GFP 小鼠与 LepR-cre;R26R;EYFP 小鼠，观察骨外膜 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs。运用流式细

胞学技术, 我们发现 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 高度表达 MSCs Marker, 并且证实了 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 为两群不同的骨外膜来源干细胞。WHO 组织对干细胞的定义包括了具有自我更新与多向分化能力, 并且高度表达 CD90、CD105 等表面标志物。所以, 我们进一步探究了所筛选细胞的自我更新与多向分化潜能。通过体外集落形成实验与体内连续移植试验, 我们观察到 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 的自我更新能力。随后, 通过体外三系分化实验以及体内的荧光示踪, 我们发现骨外膜来源的干细胞成骨与成软骨能力要强于骨髓间充质干细胞。有趣的是, 我们通过使用可诱导 Nestin-creER;R26R;EYFP 小鼠, 对不同时间点的 Nestin⁺ PDCs 进行了示踪, 结果表明 Nestin⁺ PDCs 在早期大量聚集于骨外膜外层, 并由 Trap⁺细胞募集, 向皮质骨表面逐渐迁移并大量向成骨方向分化。

本研究中, 我们将骨外膜干细胞与骨髓间充质干细胞进行了对比, 发现尽管使用同样的表面标志物筛选出来的细胞, 骨外膜来源的细胞其三系分化以及自我更新潜能也强于骨髓间充质来源的细胞, 提示细胞所处的微环境在决定干细胞的功能与状态方面起着决定性的作用。骨髓中含有多种类型的细胞如免疫细胞、造血细胞、脂肪细胞、血管内皮细胞、巨噬细胞以及大量的神经纤维, 骨髓间充质干细胞主要处于其干细胞“龕”中, 并长期受多因素调节(正负调控)。相反, 骨外膜的造血细胞与免疫细胞较少, 仅含有大量的原位巨噬细胞以及成骨相关细胞, 这样单纯的微环境为骨外膜来源干细胞提供了良好的成骨微环境。并且, 骨外膜生发层中含有大量特异性表达的骨膜素以及 H 型血管, 而这些因素都可促进干细胞成骨分化。所以, 对于干细胞的鉴定不能仅仅依赖于细胞表面标志物, 其所处的位置及微环境的时间空间动态变化都将影响着干细胞的命运与转归。

在前期研究中, 我们发现 Trap⁺细胞可以通过分泌 PDGF-BB, 从而募集 MSCs 参与成骨-成血管偶联, 促进骨量的生长与维持。为了进一步探究鉴定出的 Nestin⁺ PDCs 与 LepR⁺ PDCs 在皮质骨形成中的具体功能, 我们分别构建了 Trap-Cre;iDTR 小鼠 (Trap⁺细胞特异性清除)、Trap-Cre;Pdgfr^{fl/fl} 小鼠 (Trap⁺细胞特异性敲除 PDGF-BB)、CTSK KO 小鼠 (Trap⁺细胞分泌 PDGF-BB 增多)、Nestin-CreER;Pdgfr β 小鼠 (Nestin⁺细胞特异性敲除 Pdgfr β) 和 LepR-Cre; Pdgfr β 小鼠 (LepR⁺细胞特异性敲除 Pdgfr β) 小鼠。结果显示, Nestin⁺ PDCs 在青春期受 Trap⁺细胞分泌的 PDGF-BB

募集,参与皮质骨的形成、骨膜素的分泌、H型血管的形成以及骨外膜的动态平衡,而在成年期主要参与骨外膜血管内皮细胞的形成。相反, LepR⁺ PDCs 在成年期受 PDGF-BB 募集,参与皮质骨的形成、骨膜素的分泌以及骨外膜细胞的稳定,而在青春期无显著作用。重要的是,我们构建了皮质骨损伤模型,并发现 Nestin⁺ PDCs 和 LepR⁺ PDCs 大量迁移到骨损伤区域,参与局部微环境的形成以及成骨-血管偶联,显著的促进了骨再生修复过程。

通过本研究,我们率先鉴定了骨外膜来源的两群干细胞,并对其理化性质与功能特性进行了初步的探究,也发现了其在成骨、成软骨分化及自我更新方面对于骨髓间充质干细胞的优势。另外,我们阐明了骨外膜干细胞的位置以及在皮质骨形成与再生中的具体作用,并讨论了其在病理条件下的转归。本研究通过对骨外膜干细胞表面标志物的鉴定以及在骨形成与骨再生中的功能阐明,为临床上应用骨外膜来源干细胞提供了潜在可能性。

第二部分 骨髓间充质来源干细胞的异常分化、凋亡、自噬与衰老在骨稳态与骨退行性变中的作用

骨髓间充质来源干细胞（MSCs）作为骨骼干细胞的一个重要分支，大量分布于骨髓腔中并长期处于静止态与激活态这种动态平衡的过程中，在骨重建与塑建中维持着骨骼系统稳态。目前已知，MSCs 具有自我更新及多向分化潜能，在生理状态下，MSCs 处于相对静止态并通过增殖、分化与自噬维持着自身稳态。当骨骼系统需要重建或塑建时，MSCs 增殖能力增强，并大量向成骨细胞分化；然而，在病理状态下，MSCs 的增殖能力减弱、保护性自噬反应减弱、成骨-成脂分化异常、凋亡增加甚至出现衰老，这些改变都将导致骨稳态失衡，加重骨骼系统的退行性变，进一步破坏 MSCs 的功能与状态，造成不可逆性的损害。然而，MSCs 如何影响骨稳态，并且骨稳态的失衡及其导致的骨退行性变如何进一步影响 MSCs 的自身状态与功能尚不明了。

相比于 PDCs, MSCs 所处的骨髓腔更易受到内分泌代谢等因素调节。在骨衰老过程中，骨骼系统代谢平衡紊乱，骨髓腔中 MSCs 衰老并严重影响其增殖、髓腔中炎症因子释放增多、血运减少，这些因素将导致局部代谢微环境进一步被破坏，造成不可逆性循环[98]；在绝经后骨质疏松过程中，骨髓腔中代谢微环境改变，ROS 下降，MSCs 增殖能力下降并大量向脂肪细胞分化，造成干细胞“龕”的破坏并加速骨退行性变的进展[208]；在激素诱导性骨质疏松过程中，MSCs 由于受到短期高强度的病理性刺激，发生大量凋亡，且保护性自噬应答减弱，导致骨量减少，骨髓腔代谢微环境破坏，骨稳态失衡。随着骨骼干细胞应用领域研究的深入，在骨退行性变中 MSCs 的增殖、分化、凋亡、自噬与衰老如何影响骨稳态平衡成为目前研究的难点与热点。更重要的是，阐明 MSCs 的生理性功能与病理性改变在骨退行性变中的发生机制，并探索出配套的应对措施与治疗方法意义重大。

本研究以 MSCs 作为研究对象，通过使用三种骨退行性变模型，系统性探究了 MSCs 的增殖、分化、自噬、凋亡与衰老在骨稳态失衡与骨退行性变中的发病机制；并应用多种治疗因素，调控改善 MSCs 的功能及其微环境并观察其在骨稳态中的动态变化。

实验一 骨髓间充质来源干细胞的衰老在骨稳态与骨退行性变中的作用

1 材料

1.1 仪器设备

BSA224S 型电子天平	Sartorius, Germany
共聚焦显微镜	Olympas, USA
视体显微镜	Olympus, Japan
低温高速离心机	Hereaus, Germany
一次性滤器	Nunc, USA
BX-60 型荧光显微镜	Olympus, Japan
自动组织染色机	Thermo, Germany
超净台	吴江市净化设备总厂, 中国江苏
450 酶标仪	Biorad, USA

1.2 实验动物与试剂

C57 小鼠	第四军医大学实验动物中心
DF12 培养基	Gibco, USA
胰蛋白酶	Gibco, USA
多聚甲醛	天津红岩
青链霉素	Sigma-Aldrich, USA
正常山羊血清工作液	博士德公司, 中国
胎牛血清	Gibco, USA
PMSF	碧云天公司, 中国
PVDF 膜	Invitrogen, USA
BCA 蛋白定量试剂盒	碧云天公司, 中国

BRDU 多抗	Abcam Inc, UK
DAPI	MP Inc, USA
17 β -雌二醇	Sigma, USA
四甲基吡嗪	Sigma, USA
地塞米松	Sigma, USA
Caspase-3 检测试剂盒	碧云天公司, 中国

2 方法

2.1 显微 CT 分析

2.1.1 取材

将 20 月龄小鼠股骨与胫骨,充分剥离筋膜及肌肉组织,用无菌纱布包裹并固定。根据分组不同分别给予标记。在 4℃ 下用 4% Paraformaldehyde (PFA) 固定 4 小时,然后用 PBS 将残余多聚甲醛洗去,共三遍,每遍 10 分钟,最后一遍在 4℃ 下洗过夜;如需显微 CT 扫描,将标本制作固定模块,在待扫描标本准备完毕后,按显微 CT 的扫描要求进行操作。

2.1.2 显微 CT 分析

将 2.1.1 中所处理样本,通过 micro CT 分析不同基因小鼠皮质骨与松质骨组织的微观结构变化。扫描的参数为:扫描电压为 49KV,扫描为电流 0.2mA,分辨率 8.7 μ m。沿着扫描长骨的长轴方向逐层扫描,利用 Skyscan 软件对扫描后结果进行分析。通过重建软件 (NRecon v1.6)、分析软件(CTAn v1.9)、三维重建软件(μ CTVol v2.0) 选取胫骨骨干皮质骨与干骺端松质骨部分作为感兴趣区域 (ROI)。松质骨感兴趣区从生长板下 1mm 处延伸 0.7mm,包含 120 个层面;皮质骨感兴趣区包含胫骨干中段 0.24mm,共含 60 个层面;测量 感兴趣区域内所有骨相关参数:皮质骨厚度 (Ct.Th) 以及骨膜周长 (Ps.Pm)、体积分数 (BV/TV)、松质骨厚度 (Tb.Th) 等。在显微 CT 取材分析过程中,严格遵循双盲原则。

2.2 四甲基吡嗪髓腔内注射

将受试小鼠麻醉后,固定于超净台上。用剪刀仔细清除膝关节处毛发,显露膝

关节。用碘酒消毒 3 遍后再使用 75%的酒精脱碘 3min, 随后使用 0.5ml 27-G 的注射针, 从髌韧带内侧, 向髓腔内缓慢进针, 直至出现落空感, 每周给药三次, 共八周。

2.3 骨髓间充质干细胞的提取

将衰老组(20M)、衰老给药组(20M+TMP)、年轻组(4M)、年轻给药组(4M+TMP)小鼠分别置于超净台上, 将脱颈处死小鼠置于 70%酒精中 4-8 分钟。仔细分离小鼠股骨和胫骨, 充分去除骨面上附着的肌肉、脂肪和韧带等。剪去两端干骺端。用注射器吸取无血清培养液充分冲洗骨髓腔, 重复 2-3 次。使用滴管将收集的冲洗液直接接种于 15ml 离心管中。进行随后的流式细胞学筛选及鉴定。

2.4 流式细胞学检测

- 1) 将 2.3 所提取的不同组骨髓间充质干细胞, 滴入红细胞裂解液, 作用 10min, 并在 4℃低温下利用高速离心机以 1200r 离心 5min;
- 2) 用流式细胞学专用缓冲液重悬细胞, 并在 4℃低温下将细胞洗涤三次, 每次 5min;
- 3) 首先给予细胞加入 APC Mouse Anti-Mouse CD45.1 (Bio-Legend, 561873) 孵育, 并根据分组及实验目的不同分别加入不同抗体如 APC-conjugated anti-c-kit (Biolegend, 105811)、Pacific blue-conjugated anti-Sca-1 (Biolegend, 108119)、PEconjugated anti-CD150 (Biolegend, 115903)、FITC-conjugated anti-CD48 (Biolegend, 103402) 以及 anti-LepR-biotin (R&D Systems, BAF497), 在 4℃下孵育 30min, 并用流式洗涤液洗涤三次, 每次 5min;
- 4) 通过 5-laser BD FACS 和 FACSDiva 将细胞上机, 分别筛选出 CD48⁻Lin⁻细胞、CD48⁻Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺ (LSK) 细胞、CD150⁺CD48⁻LSK 细胞和 LepR⁺CD45⁻细胞, 验证其自我更新以及多向分化潜能, 并验证其与其他干细胞表面标志物之间的相关性; 通过 FACSCalibur flow cytometer、CellQuest software 和 Flowjo 分析流式细胞学检测结果。

2.5 免疫荧光染色

将所取不同分组小鼠股骨给予 4%多聚甲醛固定 4 小时、10% EDTA 脱钙 3 天、阿拉伯胶脱水 1 天后将组织用 OCT 包埋, 通过冰冻切片机在 -20℃切取 10 μm 厚度进行免疫荧光检测。用提前恢复到室温的 PBS 洗 1 遍, 并通过 10 分钟进行水化;

水化完成后用免疫组化笔画圈，防止染色液体渗漏，并用 PBS 将各组样本洗三遍，5 min×3 次，彻底清除免疫组化笔所留残渣。小心轻柔弃去 PBS 后，在各组样本上轻柔的滴加 Triton X-100 进行打孔，并置于 37℃ 培养箱中 15 min，然后再用 PBS 洗三遍，5 min×3 次。用二抗特异性来源种属封闭液封闭样本 1 小时，然后用抗体稀释液根据不同的抗体进行稀释，并孵育 4℃ 过夜。次日取出后置于 37℃ 敷箱中复温 1 h，并用 PBS 洗三遍，5 min×3 次。用抗体稀释液 根据不同种属不同类别，稀释二抗。每个样本中加入 250 μl 稀释后二抗，37℃ 敷箱避光孵育标本 1 h，然后用 PBS 洗三遍，5 min×3 次。轻轻吸去玻片上液体后，滴入 100 μl 含 DAPI 的封片液。使用移液器吸取适量 50% 甘油滴于载玻片上（吸取甘油时应轻柔，以免吸入气泡）。封片过程中将盖玻片从一侧缓慢下压，且不留气泡，用滤纸吸去多余封片液，4℃ 避光保存。在 Zeiss L780 激光共聚焦显微镜下通过特定选区内选取每个标本随机视野，并在镜下区域计数阳性细胞并统计。

2.6 骨髓内相关分泌蛋白 ELISA 检测

将各组组织或细胞按以下步骤进行 TGF-β、IGF-1、PDGF-BB、FGF-1 等的 ELISA 检测：

- 1) 加入 50 μl Standard Buffer 与待测 Sample 于酶标包被板上，37℃ 孵育 30 min；
- 2) 分别加入 50 μl Enzyme-labeled Solution 到标准孔与待测样本孔中，随后在 37℃ 水浴锅中孵育 30 min；
- 3) 依次加入 50 μl 显示剂 A 液与 B 液于酶标包被板标准孔与待测样本孔；
- 4) 随后置入 37℃ 恒温孵箱中静置 15 min，注意避光；
- 5) 加入 50 μl Termination Buffer 于标准孔与待测样本孔中，并静置 3 min；
- 6) 使用分光光度计（波长为 450 nm）检测各孔吸光度。

2.7 统计分析

所得数据利用 SPSS19.0 软件进行统计学单因素方差分析(one-way ANOVA)进行组间比较，以 Bonferroni 进行两两互相比，统计数据呈现为均数±标准差 ($\bar{X} \pm SD$)， $p < 0.05$ 为具有显著统计学差异。

3 结果

3.1 自然老化小鼠骨稳态与髓内微环境显著异常，而髓腔内注射四甲基吡嗪（Tetramethylpyrazine, TMP）可特异性清除衰老细胞，纠正内环境紊乱。

本实验中，我们采用 20 月龄自然衰老小鼠作为受试组，4 月龄成年小鼠作为对照组，并通过 SA- β Gal 化学染色与 p16^{INK4a} 免疫荧光染色观察在自然衰老情况下骨髓腔中的细胞衰老状况。结果显示，相比于 4 月龄小鼠，自然衰老小鼠骨髓腔中 SA- β Gal 阳性细胞与 p16^{INK4a} 阳性细胞显著增多，提示自然衰老状态下，小鼠骨髓腔中衰老细胞大幅度增加 (图 2-1-1, A-F)。在我们前期研究中发现，四甲基吡嗪全身给药可以纠正糖皮质激素诱导的骨质疏松以及骨代谢异常。由于四甲基吡嗪可显著改善细胞功能状态，促进其活性，且无毒性，所以，我们猜想靶向递送四甲基吡嗪至骨髓腔是否可直接改善骨退行性变，并对衰老细胞有一定的治愈作用。结果显示，髓腔内靶向注射四甲基吡嗪可显著下调 metaphysis 和 diaphysis 中的 SA- β Gal 阳性细胞与 p16^{INK4a} 阳性细胞的数量，抑制细胞衰老 (图 2-1-1, A-F)。Micro CT 结果显示，自然衰老小鼠的松质骨量、松质骨厚度与 4 月龄小鼠相比显著下降；髓腔内注射 TMP 不仅可显著改善自然衰老小鼠的松质骨量、且对 4 月龄成年小鼠的松质骨量也有一定的促进作用 (图 2-1-1, G-M)。有趣的是，髓腔内注射 TMP 并不能显著纠正皮质骨的缺失，提示皮质骨更易受到机械应力调节，而松质骨由于所处微环境的不同，易受全身内分泌代谢因素调控(图 2-1-1, L,M)。为了验证在自然衰老情况下，髓腔内细胞所处微环境有无改变，我们通过 ELISA 酶联免疫吸附测定实验，测定了髓腔内多种生长因子如 TGF- β 1, PDGF-BB, IGF-1 和 FGF-1 的量。结果显示，与 4 月龄成年小鼠相比，自然衰老小鼠骨髓腔中多种生长因子显著下调，内环境紊乱，骨稳态失衡，然而，髓腔内注射四甲基吡嗪后可显著增加衰老小鼠 TGF- β 1, PDGF-BB, IGF-1 和 FGF-1 的水平 (图 2-1-1, N-Q)。有趣的是，四甲基吡嗪不仅可上调衰老小鼠骨髓腔中各种生长因子的水平，也可显著上调 4 月龄成年小鼠骨髓腔中的量，这也解释了 TMP 除了改善衰老小鼠骨稳态失衡外，也可促进正常小鼠骨量的增长(图 2-1-1, N-Q)。

3.2 自然老化小鼠骨髓间充质干细胞衰老显著增加，而四甲基吡嗪可特异性抑制其衰老

为了观察自然衰老小鼠髓内间充质干细胞是否发生衰老，我们选用了 LepR 作为骨髓间充质干细胞的 marker。有研究表明，LepR⁺细胞作为成年期最主要的髓内干细胞群，是小鼠成年期骨与软骨的主要来源。免疫荧光结果显示，自然衰老小鼠髓腔内 LepR⁺细胞大量表达衰老 marker p16^{INK4a}，且细胞增殖 marker Brdu 阳性率下降，提示其发生衰老的同时增殖也受到影响 (图 2-1-2, A-C)。为了验证四甲基吡嗪是否特异性作用于骨髓来源的 LepR⁺干细胞，我们通过流式细胞学技术筛选出自然衰老小鼠髓腔中的 LepR⁺CD45⁻的 MSCs,并在体外培养条件下加入 50 μM TMP (图 2-1-2, D)。p16^{INK4a}，SA-βGal 和 Brdu 染色结果显示，体外给予 TMP 干预可以特异性的降低 LepR⁺ MSCs 衰老 markers 如 p16^{INK4a}，SA-βGal 的表达，并能显著促进 MSCs 增殖 (图 2-1-2, E-J)。RT-PCR 结果显示，50 μM TMP 可显著下调衰老的 LepR⁺ MSCs 的 p16^{INK4a}，p21 表达并上调增殖 marker Ki67 的表达 (图 2-1-2, K-M)。然而，另一调控细胞衰老的 marker-p53 (肿瘤抑制因子) 的变化并不显著(图 2-1-2, N)。

3.3 EZH2-H3K27me3 调控骨髓间充质干细胞衰老

为了阐明骨髓间充质干细胞在自然衰老小鼠中衰老的具体机制，我们观察了 Ezh1 与 Ezh2 甲基转移酶家族。有学者发现，Ezh2 不仅在细胞核内发挥着抑制细胞衰老的作用，在细胞核外也可通过对底物蛋白的甲基化影响生物过程和疾病发生。我们通过流式细胞学技术筛选出 4 月龄小鼠与自然衰老小鼠髓腔内的 LepR⁺CD45⁻MSCs。Western-blot 与 RT-PCR 结果显示，衰老小鼠 LepR⁺ MSCs 中 Ezh2 表达明显下降，但 Ezh1 维持不变，提示 Ezh2 与此衰老过程密切相关 (图 2-1-3, A-D)。我们进一步发现，Ezh2 下游的 H3K27me3 也在衰老 LepR⁺ MSCs 中显著下降，提示 Ezh2-H3k27me3 参与调控此过程，且四甲基吡嗪干预后可显著提高 Ezh2 与 H3k27me3 的表达量，从而逆转此过程 (图 2-1-3, C, D)。为了明确此发现，我们设计了衰老 markers p16、p21、p27、p15 在 LepR⁺ MSCs 中 H3K27me3 的结合位点，并通过 siRNA knock-down LepR⁺ MSCs 中的 Ezh2 表达，观察衰老条件下四甲基吡嗪干预后上述衰老 markers 在 H3K27me3 结合位点的富集情况(图 2-1-3, E)。Chip

assay 结果显示, 四甲基吡嗪可显著促进 H3K27me3 结合下游衰老因子 p16 和 p21; 当下调 Ezh2 后, 衰老 LepR⁺ MSCs 中 H3K27me3 对下游衰老因子的结合显著减少, 导致衰老因子 p16 与 p21 在基因与蛋白层面表达显著增高, 增殖因子 Ki67 大幅度下降。有趣的是, 当 knock-down Ezh2 后, TMP 对 LepR⁺ MSCs 的抗衰老能力几乎消失, 提示 Ezh2-H3K27me3 是调控骨髓间充质干细胞衰老的关键因子(图 2-1-3, E-I)。我们进一步通过体外 p16^{INK4a}, SA-βGal 和 Brdu 染色发现, Ezh2 下调致 LepR⁺ MSCs 衰老进一步加重, 且增殖受到显著抑制, 四甲基吡嗪的抗衰老作用几乎消失(图 2-1-3, J-L)。这些结果提示 Ezh2-H3k27me3 可作为潜在治疗靶点, 通过靶向递送药物激活此通路, 从而达到抑制干细胞衰老从而改善骨稳态。

3.4 骨髓间充质干细胞衰老导致髓内造血系统显著紊乱, 骨稳态失衡

有研究表明, LepR⁺ MSCs 紧贴于髓腔内的静脉系统旁, 并分泌多种造血维持因子如 CXCL12 与 SCF, 从而维持造血系统稳态。当 MSCs 衰老导致功能下降后, 髓腔内造血系统是否可以维持仍是未知。我们通过流式细胞学技术筛选出 4 月龄成年小鼠与自然衰老小鼠髓腔内 LepR⁺CD45⁻ MSCs, 并检测其造血维持因子的表达情况。RT-PCR 结果显示, 衰老 LepR⁺ MSCs 造血维持因子 Cxcl12, c-kit ligand、angiopoietin-1、interleukin-7 和 Vascular cell adhesion molecule-1 显著下降, 提示造血维持功能受损(图 2-1-4, A-E)。TMP 处理组可显著上调衰老后受损的造血维持因子, 而对未衰老 MSCs 无促进作用。为了进一步探究骨髓间充质干细胞衰老对造血系统的影响, 我们通过流式细胞学技术在 4 月龄与自然衰老小鼠骨髓与脾脏中筛选出了不同阶段的造血系细胞包括单核细胞、Lin-CD48⁻细胞、LSK(Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺)CD48⁻未成熟造血干细胞与 LSK CD150⁺CD48⁻造血干细胞。流式细胞学检测结果显示, 自然衰老小鼠髓腔中 LSKCD48⁻未成熟造血干细胞与 LSK CD150⁺ CD48⁻造血干细胞显著减少(图 2-1-4, F-I), 且对应脾脏中的上述细胞显著增加(图 2-1-4, J-M), 提示骨髓间充质干细胞衰老对造血系统的显著抑制作用。有趣的是, 髓腔内注射四甲基吡嗪可显著改善衰老后导致的造血系统损害、抑制髓内造血细胞向外周迁移, 维持造血系统与骨骼系统稳态。

3.5 骨髓间充质干细胞衰老显著影响 H 型血管的数量与生长,加重骨稳态失衡

前期研究表明, 衰老小鼠骨髓腔中生长因子显著减少, 骨髓微环境受损。另有研究表明, H 型血管可通过分泌多种因子, 促进成骨-成血管偶联, 增加局部代谢微环境, 并诱导新生骨的形成。为了进一步阐明骨髓间充质干细胞衰老对骨稳态以及髓内微环境的影响, 我们系统观察了自然衰老小鼠髓腔内 H 型血管的数量与功能变化。通过免疫荧光染色, 我们发现自然衰老小鼠髓腔内 H 型血管 ($CD31^{hi}Emcn^{hi}$) 数量显著减少, 且形态发生变化, 分支减少 (图 2-1-5, A, B)。四甲基吡嗪局部注射衰老小鼠骨髓腔后, H 型血管显著增多。通过 Elisa 酶联免疫吸附试验证实, 衰老小鼠髓腔内成血管因子 VEGF 和 PDGF-BB 分泌减少, 而四甲基吡嗪可减缓上述因子的下调 (图 2-1-5, C, D)。我们进一步通过流式细胞学技术, 验证了 $CD31^{hi}Emcn^{hi}$ 细胞在自然衰老小鼠骨髓腔中显著下调, 并筛选出了 $CD31^{hi}Emcn^{hi}$ 血管内皮细胞用来检测体外 VEGF 基因的表达; RT-PCR 结果显示, 衰老小鼠筛选出的 $CD31^{hi}Emcn^{hi}$ 血管内皮细胞 VEGF 表达显著下调, 而四甲基吡嗪可大幅上调衰老内皮细胞 VEGF 的表达, 提示其促血管形成作用 (图 2-1-5, E-G)。为了进一步验证衰老小鼠 H 型血管生成减少, 我们将流式细胞学技术筛选出的 H 型血管内皮细胞体外进行成血管培养。结果显示, 衰老小鼠体内筛选出的 H 型血管内皮细胞成血管能力显著下降、出芽能力受损, 血管分支长度下降, 而四甲基吡嗪体外培养后可显著促进 H 型内皮细胞成血管, 改善其出芽能力, 并促进其血管分支增长 (图 2-1-5, H-J)。我们意外发现, 衰老小鼠髓腔内除了造血系统抑制、H 型血管形成能力受损外, 炎性因子如 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 和 $IL-6$ 分泌显著增加 (图 2-1-5, K-M)。RT-PCR 结果进一步证实, 衰老小鼠髓腔内细胞炎性因子如 $IFN-\gamma$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 与 $IL-6$ 表达下调, 且四甲基吡嗪不仅可抑制衰老小鼠髓腔内炎性因子的释放, 也显著下调炎性因子的表达 (图 2-1-5, N-Q)。以上结果证实, 衰老小鼠体内骨髓间充质干细胞大量发生衰老, 导致髓内造血系统抑制、代谢微环境受损、炎性因子释放、骨稳态失衡。而通过四甲基吡嗪靶向清除骨髓间充质干细胞可显著改善 MSCs 衰老引起的多种病理状态, 恢复骨稳态。

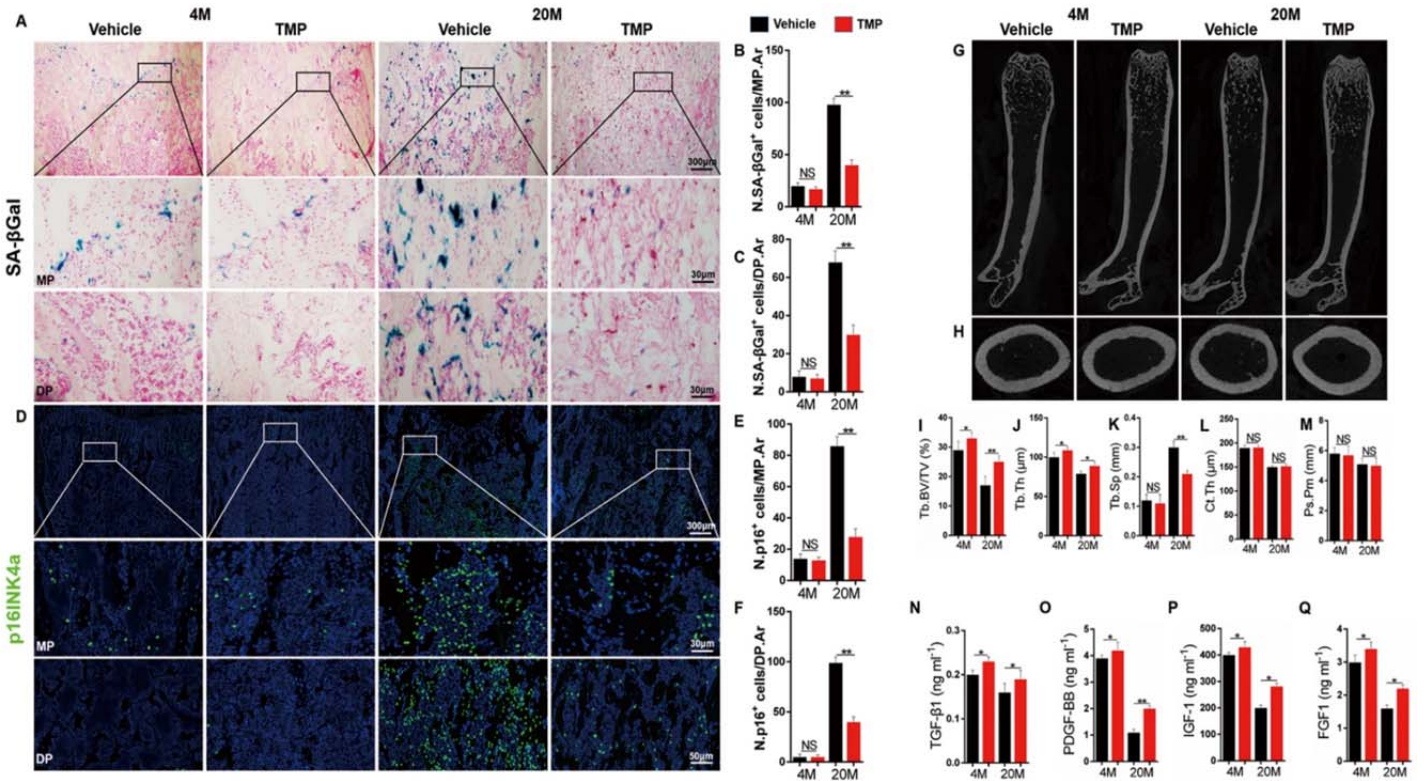


图 2-1-1 自然老化小鼠髓内细胞衰老增多，而髓腔内注射四甲基吡嗪可改善骨稳态

(A-C) SA-βGal 化学染色及 metaphysis 和 diaphysis 中 SA-βGal⁺细胞数；(D) p16^{INK4a} 免疫荧光染色及 metaphysis 和 diaphysis 中 p16^{INK4a}细胞数；(G-M) Micro CT 及松质骨量、松质骨厚度、松质骨间隙与皮质骨厚度和骨膜周长统计；(N-Q) ELISA 酶联免疫吸附测定实验测定髓腔内多种生长因子如 TGF-β1, PDGF-BB, IGF-1 和 FGF-1 的量；* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 代表有统计学差异，NS 代表无统计学差异。

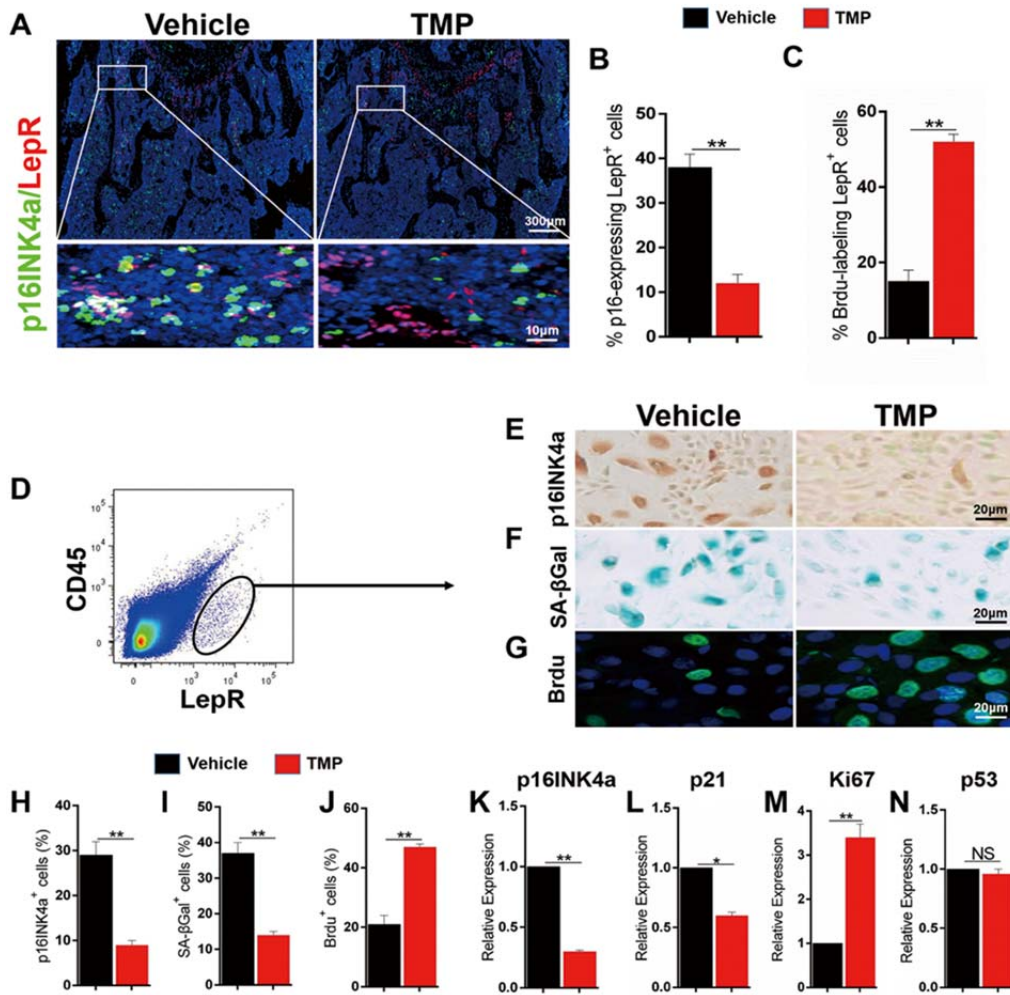


图 2-1-2 自然老化小鼠骨髓间充质干细胞衰老显著增加，四甲基吡嗪可特异性抑制其衰老

(A-C) p16^{INK4a}、LepR 与 BrdU 免疫荧光染色及统计；(D)流式细胞学技术筛选骨髓中 LepR⁺CD45⁻ 间充质干细胞；(E) p16^{INK4a} 化学染色；(F) SA-βGal 化学染色；(G) BrdU 细胞免疫荧光染色；(H-J) p16^{INK4a}⁺细胞、SA-βGal⁺细胞与 BrdU⁺细胞计数及统计；(K-N) RT-PCR 检测 p16^{INK4a}、P21、Ki67 及 P53 的表达量。**p*<0.05、***p*<0.01、****p*<0.001 代表有统计学差异，NS 代表无统计学差异。

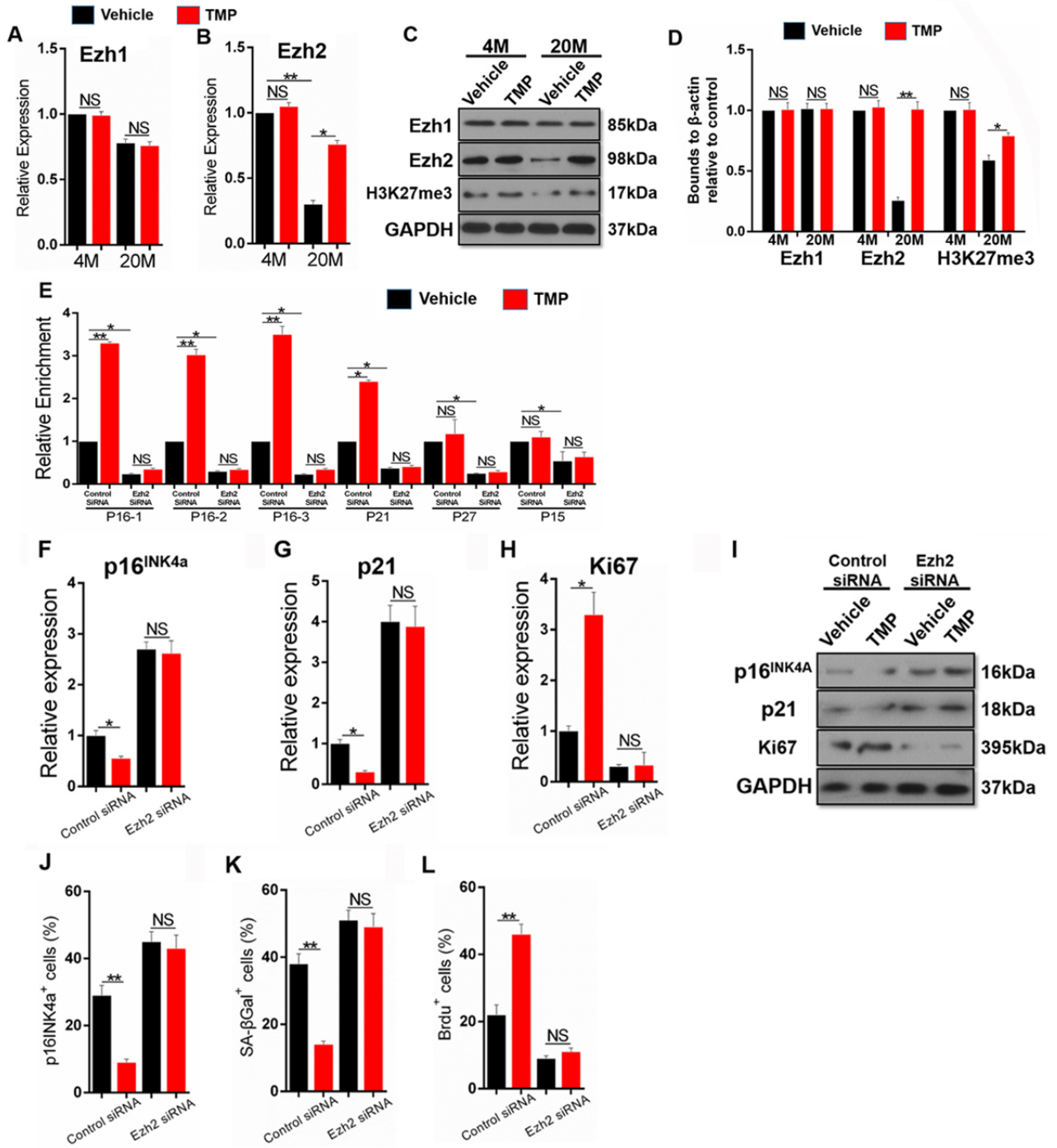


图 2-1-3 EZH2-H3k27me3 调控骨髓间充质干细胞衰老

(A-B) RT-PCR 检测 LepR⁺骨髓间充质干细胞中 Ezh1 与 Ezh2 的表达量；(C-D) Western-blot 检测 LepR⁺骨髓间充质干细胞中 Ezh1、Ezh2 与 H3k27me3 的蛋白量；(E) Chip assay 检测 Ezh2-H3K27me3 与 P16、P21、P27 及 P15 的结合效率；(F-H) RT-PCR 检测 LepR⁺骨髓间充质干细胞中 P16、P21 与 Ki67 的表达量；(I) Western-blot 检测 LepR⁺骨髓间充质干细胞中 P16、P21 与 Ki67 的蛋白量；(J-L)免疫化学与免疫荧光染色观测 P16⁺细胞、SA- β Gal⁺细胞与 BrdU⁺细胞并统计。* p <0.05、** p <0.01、*** p <0.001 代表有统计学差异，NS 代表无统计学差异。

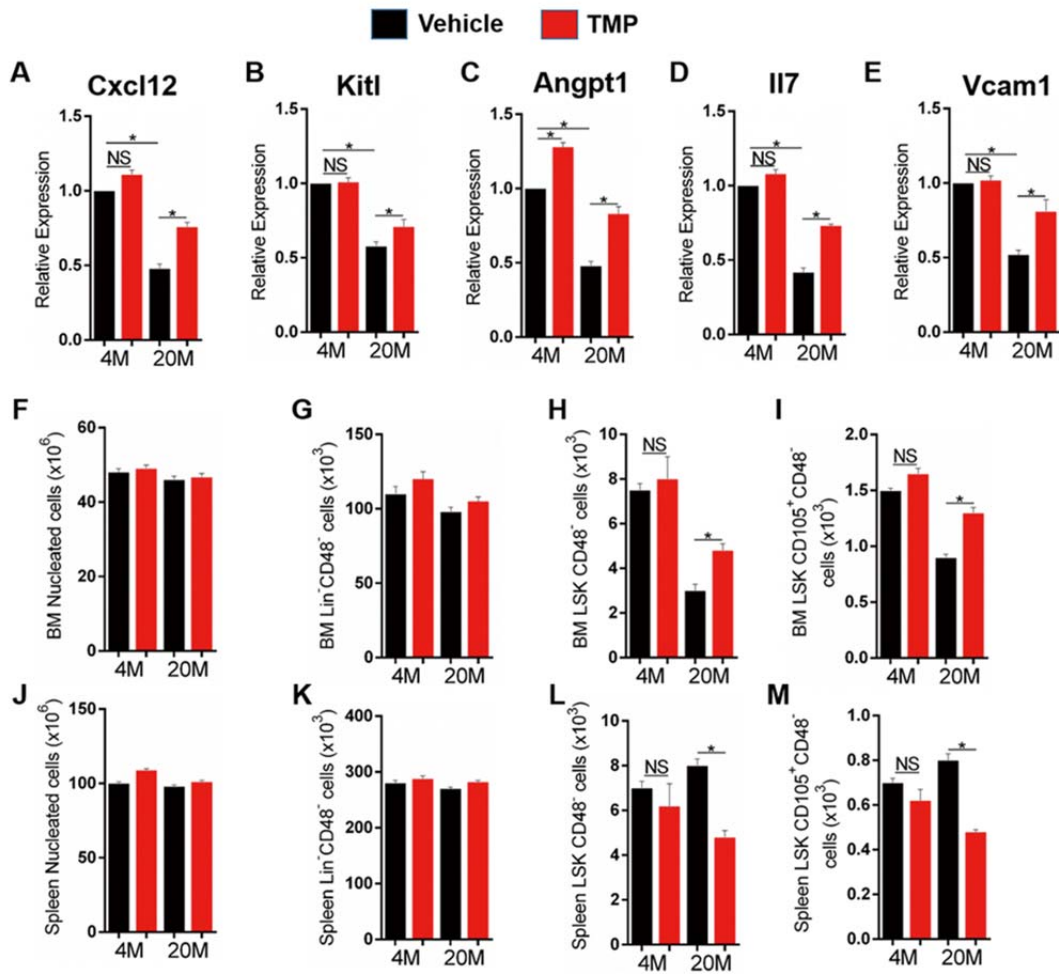


图 2-1-4 骨髓间充质干细胞衰老导致髓内造血系统显著紊乱，骨稳态失衡

(A-E) RT-PCR 检测 $LepR^+$ 骨髓间充质干细胞中造血维持因子 Cxcl12、KitL、Angpt1、IL7 与 Vcam1 的表达量；(F-I) 流式细胞学检测骨髓中单核细胞数、 Lin^-CD48^- 细胞、LSK $CD48^-$ 细胞与 LSK $CD105^+CD48^-$ 细胞数；(J-M) 流式细胞学检测脾脏中单核细胞数、 Lin^-CD48^- 细胞、LSK $CD48^-$ 细胞与 LSK $CD105^+CD48^-$ 细胞数并统计。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 代表有统计学差异，NS 代表无统计学差异。

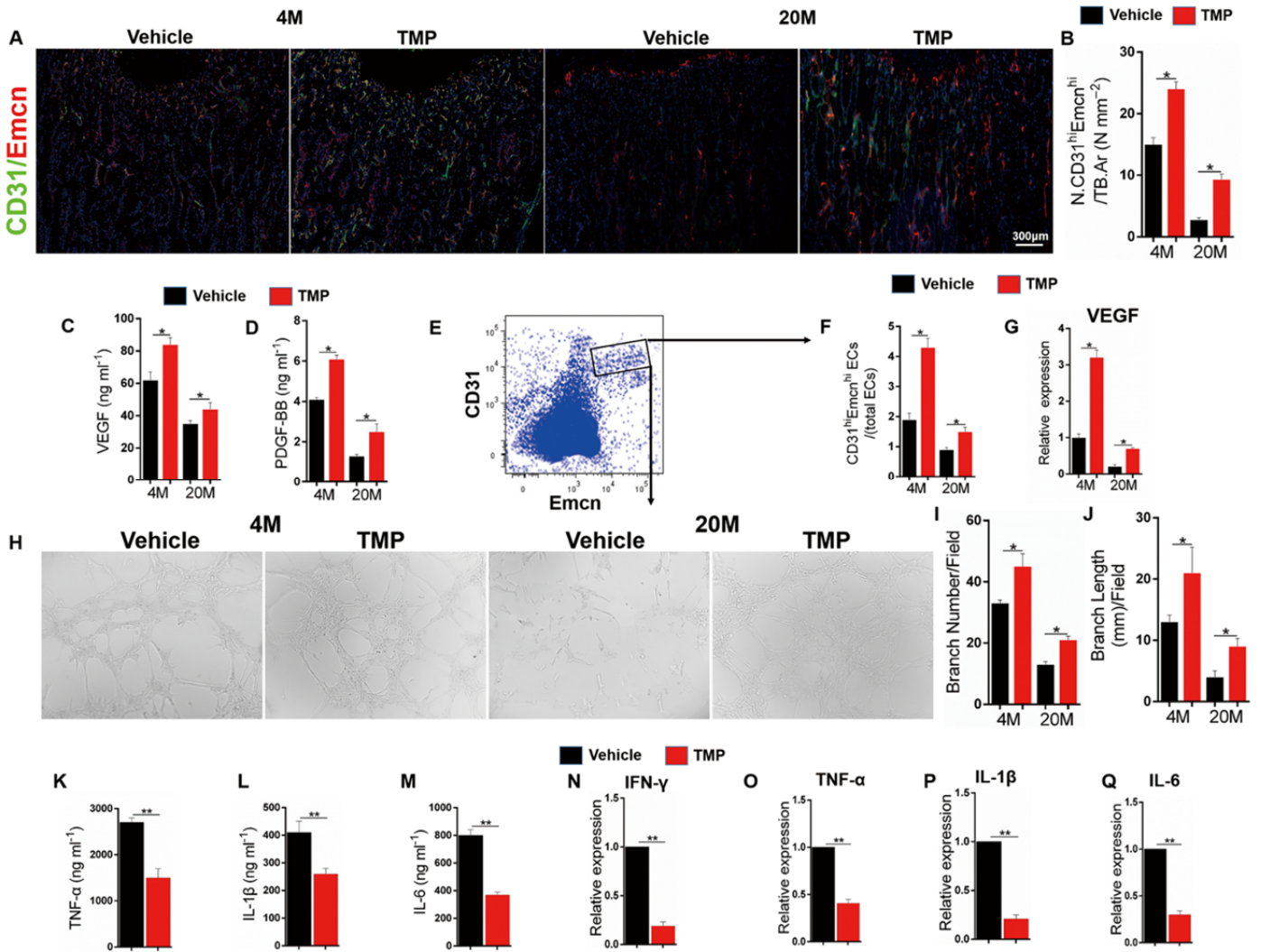


图 2-1-5 骨髓间充质干细胞衰老显著影响 H 型血管的数量与生长, 促进炎症因子释放, 加重骨稳态失衡

(A-B) CD31、Emcn 免疫荧光染色及统计; (C-D) ELISA 酶联免疫吸附测定实验测定髓腔内 VEGF、PDGF-BB 的量; (E-F)流式细胞学筛选 CD31⁺Emcn⁺血管内皮细胞并统计; (G)RT-PCR 检测流式细胞学筛选 CD31⁺Emcn⁺血管内皮细胞中 VEGF 表达量; (H-J) 血管形成试验并计数血管生芽能力与分支长度; (K-M) ELISA 酶联免疫吸附测定实验测定髓腔内 TNF-α、IL-1β 与 IL-6 的分泌量; RT-PCR 检测髓腔内 IFN-γ、TNF-α、IL-1β 与 IL-6 的表达量。**p*<0.05、***p*<0.01、****p*<0.001 代表有统计学差异, NS 代表无统计学差异。

4 讨论

人体老化是每个人必经的自然生理过程，看似平常但会伴随一系列全身与局部退行性改变。在骨骼系统中，老化常常伴随着髓腔内衰老细胞大量蓄积，引起全身代谢微环境与局部 niche 受影响，进一步加重骨骼退行性变。骨髓间充质干细胞作为髓腔中功能最为重要的细胞群体，对全身骨量以及造血系统的维持起到至关重要的作用。有研究表明，LepR⁺干细胞大量存在于成年期后小鼠的骨髓腔中，尤其是静脉血管旁，分泌多种因子调节骨与软骨生长，并维持造血系统的稳态。我们首次发现，自然衰老小鼠髓腔内骨髓间充质干细胞大量发生衰老，导致骨量下降、生长因子减少、炎症因子释放增加、血运减少、骨稳态被严重破坏，且甲基转移酶 Ezh2 介导的 H3K27me3 的上调以及其下游衰老因子的抑制是自然老化小鼠 MSCs 衰老的主要原因。

从发病机制来分析，细胞衰老(Cell Senescence)的发生机制与机体衰老(Aging)不同，但是其内在联系密切。机体衰老导致的全身内分泌脏器功能下降，并不能代表所有细胞都可发生衰老。目前，细胞衰老认为是细胞在染色体及分泌组学上的功能性障碍，常伴有细胞周期的阻滞以及细胞功能的大幅下降。细胞衰老常用的指标有 p16^{INK4a}、p53、p21^{CIP1}、溶酶体 β -galactosidase 活性，并伴有炎症因子的大量释放以及染色体的破坏。虽然干细胞衰老已在多器官系统研究广泛，但骨髓间充质干细胞衰老在骨稳态与骨代谢中的作用尚不明朗。因此，阐明 MSCs 衰老的具体机制并通过靶向治疗措施治疗干细胞衰老及其导致的骨退行性变意义深远。

那么在自然衰老过程中，骨髓间充质干细胞是如何逐渐发生衰老呢？我们发现，除了髓腔内微环境的改变外，LepR⁺ MSCs 的 Ezh2-H3K27me3 显著下调，导致下游的众多衰老调控因子如 p16^{INK4a}、p21^{CIP1} 抑制作用减弱，引起其表达上调，从而诱导干细胞发生衰老。这种在小鼠自然衰老过程中 MSCs 自身的变化报道极少，且无详细机制探讨。我们前期研究中发现，应用川芎提取物四甲基吡嗪，可显著改善糖皮质激素过量导致的骨质疏松以及干细胞凋亡，且在体内给药中未发现显著毒性，提示其为潜在的靶向治疗药物。在本研究中，我们通过髓腔内靶向给予四甲基吡嗪，发现 TMP 可特异性的激活 LepR⁺ MSCs 的 EZH2-H3K27me3 的表达量，对干细胞衰

老有直接抑制作用。

那么衰老的干细胞是如何影响骨稳态的失衡，导致骨退行性变呢？最新研究表明，细胞在经历衰老的过程中，细胞的蛋白质分泌情况发生改变，此现象被称作衰老相关分泌表型（Senescence-associated secretory phenotype, SASP）。衰老干细胞分泌的众多炎性因子，可导致髓腔内微环境发生改变，代谢平衡被打乱，导致骨代谢紊乱，骨稳态失衡。另外，骨髓间充质干细胞在生理情况下通过分泌 CXCL12 与 SCF 维持造血干细胞的功能与数量。当 MSCs 衰老时，其分泌的众多造血细胞维持因子如 Cxcl12, c-kit ligand、angiopoietin-1、interleukin-7 和 vascular cell adhesion molecule-1 显著下降，导致不同阶段的造血系细胞包括 LSK(Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺)CD48⁻ 未成熟造血干细胞与 LSKCD150⁺CD48⁻造血干细胞数量减少、髓外造血增加，进一步加重髓内微环境代谢紊乱。其次，MSCs 与血管内皮细胞位置连接紧密，交相呼应，当 MSCs 功能受阻后，“Mesenchymal-endothelial transition”被破坏，血管内皮细胞功能受损，导致髓腔内血供减少，且 H 型血管也大幅度减少，进一步导致髓腔内的微环境恶化，加速骨量丢失，骨稳态失衡。

近年来，众多研究通过靶向清除特异位点的衰老细胞，从而治疗相应组织的退行性变均达到良好的疗效。在本研究中，我们尝试运用髓腔内注射四甲基吡嗪，发现 TMP 可靶向清除衰老的骨髓间充质干细胞，显著改善 MSCs 功能以及周围微环境；通过上调 EZH2-H3K27me3 抑制干细胞衰老；促进衰老干细胞造血维持因子的表达；维持髓腔内 H 型血管的生长。

以上结果表明，在自然老化过程中，骨髓间充质干细胞可发生衰老而导致功能障碍，并通过分泌炎性因子引起骨髓代谢微环境紊乱，骨稳态失衡，而此结果会进一步加重骨髓间充质干细胞衰老，导致以上结果进入恶性循环。通过我们的研究发现，靶向清除髓腔内骨髓间充质干细胞衰老为治疗骨退行性变的关键，MSCs 上的 Ezh2-H3k27me3 可作为潜在靶点，为临床治疗衰老引起的骨退行性变提供新方法与新思路。

实验二 骨髓间充质来源干细胞的凋亡与自噬在骨稳态与骨退行性变中的作用

1 材料

1.1 仪器设备

BSA224S 型电子天平	Sartorius, Germany
共聚焦显微镜	Olympas, USA
L-500 离心机	湘仪实验仪器有限公司
BX-60 型荧光显微镜	Olympus, Japan
自动组织染色机	Thermo, Germany
超净台	吴江市净化设备总厂, 中国江苏
XMT-DA 电热恒温水浴锅	湘仪实验仪器有限公司
手术器械、缝线、辅料等	空军军医大学教保中心
450 酶标仪	Biorad, USA

1.2 实验动物与试剂

C57 小鼠	空军军医大学实验动物中心
DF12 培养基	Gibco, USA
胰蛋白酶	Gibco, USA
多聚甲醛	天津红岩
Triton X-100	上海碧云天生物科技公司
地塞米松	Sigma-Aldrich, USA
3-甲基腺嘌呤	Sigma-Aldrich, USA
雷帕霉素	Cell Signaling Technology, USA
巴弗洛霉素 A1	Sigma-Aldrich, USA
胎牛血清	Gibco, USA
单克隆兔抗大鼠 LC3B 抗体	Cell Signaling Technology, USA

人参皂苷 Rb2	上海碧云天生物科技公司
17 β -雌二醇	Sigma, USA
EPA	Abcam, USA
DHA	Sigma, USA
Caspase-3 检测试剂盒	上海碧云天生物科技公司

2 方法

2.1 地塞米松的细胞毒性检测

将骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 以每孔 3×10^3 个接种到 96 孔板上, 待细胞基本长满后, 弃除培养基(α -MEM 培养液、10% FBS、1% Penicillin-Streptomycin), 分别将浓度 0 μ M (Vehicle Control), 1×10^{-8} μ M, 1×10^{-7} μ M, 1×10^{-6} μ M, 1×10^{-5} μ M 的地塞米松 (Dexamethasone, DEX) 无血清培养基加至 96 孔板中, 分别培养 24h 和 72h, 观察 DEX 对细胞增殖及毒性的影响。在各个观察点, 利用 MTT 检测液对细胞活力进行检测。

2.2 流式细胞仪活死细胞 (Annexin V-FITC/PI) 检测

细胞处理:

将 BMSCs 接种到细胞 6 孔板上 (1.5×10^5 个细胞/每孔), 待细胞基本铺开到 80% 后, 弃除孔板中的培养基, 并加入不同浓度的 Dexamethasone 培养 48 h。检测步骤:

- 1) 提前准备流式专用管并标记各实验组, 在 37 $^{\circ}$ C 预热环境下常规消化各个组的细胞, 收集各组中的细胞悬液, 并做细胞计数 ($>4 \times 10^5$ 个细胞)。
- 2) 使用离心机, 将 1) 中准备的细胞悬液在 1200 rpm 转速下离心 5 min。PBS 洗 3 遍。
- 3) 加入 Buffer Solution (0.01 M 肝素, 0.14 M 氯化钠, 2.5 mM 氯化钙, pH 7.4), 再次离心 5 min。
- 4) 将含 PI 和 FITC-Annexin V 的混合标记液共 100 μ l 加入管中, 避光孵育; 1200rpm 离心一遍后再用 Buffer Solution 洗一遍。
- 5) 加入 Illumination Buffer 并在暗室中 4 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。通过流式细胞仪, 采用双波检测各组的荧光表达 (488nm, 515 nm)。

2.3 显微 CT 分析

2.3.1 取材

将 3 月龄小鼠股骨与胫骨, 分别剥离筋膜及肌肉组织, 用无菌纱布包裹并固定。根据分组不同分别给予标记。在 4℃ 下用 4% Paraformaldehyde (PFA) 固定 4 小时, 然后用 PBS 将残余多聚甲醛洗去, 共三遍, 每遍 10 分钟, 最后一遍在 4℃ 下洗过夜; 如需显微 CT 扫描, 将标本制作固定模块, 在待扫描标本准备完毕后, 按显微 CT 的扫描要求进行操作。

2.3.2 显微 CT 分析

将 2.3.1 中所处理样本, 通过 micro CT 分析不同基因小鼠皮质骨与松质骨组织的微观结构变化。扫描的参数为: 扫描电压为 49KV, 扫描为电流 0.2mA, 分辨率 8.7 μm 。沿着扫描长骨的长轴方向逐层扫描, 利用 Skyscan 软件对扫描后结果进行分析。通过重建软件 (NRecon v1.6)、分析软件 (CTAn v1.9)、三维重建软件 (μCTVol v2.0) 选取胫骨骨干皮质骨与干骺端松质骨部分作为感兴趣区域 (ROI)。松质骨感兴趣区从生长板下 1mm 处延伸 0.7mm, 包含 120 个层面; 皮质骨感兴趣区包含胫骨骨干中段 0.24mm, 共含 60 个层面; 测量 感兴趣区域内所有骨相关参数: 皮质骨厚度 (Ct.Th) 以及骨膜周长 (Ps.Pm)、体积分数 (BV/TV)、松质骨厚度 (Tb.Th) 等。在显微 CT 取材分析过程中, 严格遵循双盲原则。

2.4 Caspase-3 活性检测

将各组细胞常规消化并用离心机以 1000 rpm 离心 5 min。弃除上清液并加入 Cell Lysis Buffer 冰上裂解 15min 后, 再次用 4℃ 低温离心机 12000 rpm 离心 15 min。吸取 Supernate Sample 50 μl 并与检测 Buffer 以及 Ac-DEVD-pNA 混匀, 37℃ 孵育 2 h。通过 Spectrophotometric Assays 检测各组 OD 值, 绘制标准曲线检测 Caspase-3 IU。

2.5 BMSCs TUNEL 凋亡检测

2.5.1 细胞标本准备

1) 弃除不同处理组细胞中的 Medium 并加入 4% Paraformaldehyde, 常温固定 1h。

- 2) 用提前预冷的 PBS 洗 × 3 次, 每遍 5 min。
- 3) 加入准备好的 TritonX-100 Cell Penetration Buffer, 在冰上孵育细胞 2 min。

2.5.2 制备 TUNEL 细胞凋亡反应液

- 1) 将 R&D 公司的 TUNEL 细胞凋亡反应液质备好, 用移液器吸出 2 号标记液 100 μl , 当作阴性对照, 全程注意避光。
- 2) 将 50 μl 1 号 Enzyme Reaction Solution 加入到剩余的 450 μl Label Reaction Buffer 中, 充分混合后加入 TUNEL Mix Buffer Solution 500 μl 。注意低温、避光保存, 现配现用。

2.5.3 TUNEL 细胞凋亡检测

- 1) 弃除细胞上的穿透液, 用提前预冷的 PBS 洗×3 遍, 每遍 5 min。之后每组加入 50 μl TUNEL Mix Buffer Solution。均匀地将反应液覆盖单细胞表面, 置于湿盒中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 60 min。
- 2) PBS 洗涤 3 遍, 每遍 5 min。加入 DAPI 染色液(1:1000), 常温孵育 5 min。
- 3) PBS 洗涤 3 遍, 每遍 5 min。待干燥后甘油封片, 在 Confocal Microscope 下观察凋亡细胞, 随机选取 3 个视野拍照并计数统计。

2.6 透射电镜(Transmission Electron Microscope)观察骨髓间充质干细胞内自噬小体(Autophagosome)

- 1) 将各处理组骨髓间充质干细胞消化并收集于离心管内, 在离心机中以 1200 r/min 离心 5min。
- 2) 小心弃去细胞上清液, 注意不要弃掉管底细胞, 吹匀细胞后将 1.5 ml 细胞悬液加入 EP 管中,再次离心 15min。
- 3) 弃除小管内上清液, 用移液器吸取 1 ml 固定液, 沿小管壁缓慢加入, 并充分覆盖细胞表面。包埋切片后, 在透射电镜下观察分析细胞并拍照计数统计。

2.7 统计分析

所得数据利用 SPSS19.0 软件进行统计学单因素方差分析(one-way ANOVA)进行组间比较, 以 Bonferroni 进行两两互相比, 统计数据呈现为均数 \pm 标准差($\bar{X} \pm \text{SD}$), $p < 0.05$ 为具有显著统计学差异。

3 结果

3.1 高浓度地塞米松 Dexamethasone (Dex)可诱导小鼠骨髓间充质干细胞发生凋亡

糖皮质激素为临床广泛应用药物，具有强大的抗炎作用并能在疾病急性期提升机体抵抗力。然而，对糖皮质激素的滥用也导致了诸多骨骼系统并发症，包括股骨头坏死、骨髓微环境改变，骨关节炎等。本研究旨在探究糖皮质激素对骨髓间充质干细胞的影响以及其内在机制，并提出多种治疗手段，解决临床糖皮质激素滥用所致的骨稳态失衡与骨退行性变。本实验中，我们从3月龄 C57BL/6 小鼠骨髓中提取出骨髓间充质干细胞 (BMSCs)，常规培养 24h 后，给予不同浓度地塞米松干预(10^{-9} M、 10^{-8} M、 10^{-7} M、 5×10^{-7} M、 10^{-6} M、 5×10^{-6} M、 10^{-5} M)，并通过 Annexin V-FITC/PI 染色、流式细胞学分析细胞死亡及凋亡情况。结果显示，Dex 可诱导骨髓间充质干细胞凋亡，且随着浓度增长、细胞凋亡率逐渐增高，到 10^{-6} M 达到峰值 (图 2-2-1, A, B)。我们进一步通过 Caspase3 试剂盒验证上述发现，结果同前， 10^{-6} M Dex 可显著诱导细胞凋亡，且随着 Dex 浓度继续增长，细胞凋亡率无显著增加 (图 2-2-1, C)，提示 10^{-6} M 为 Dex 诱导细胞凋亡的平台期浓度。

3.2 小鼠骨髓间充质干细胞的保护性自噬可抑制其凋亡进展，恢复骨稳态失衡

脂肪酸作为体内营养代谢物质之一，广泛参与生物体功能的稳定与补给。研究发现，脂肪酸可促进骨髓间充质干细胞的功能、并从多方面改善小鼠骨质疏松后的骨量丢失以及内分泌紊乱。在脂肪酸家族中，Omega3 与 Omega6 脂肪酸家族在体内的比例常作为机体代谢是否保持稳态的标志，在骨骼系统中，Omega3 脂肪酸可促进 BMSCs 成骨分化，而 Omega6 脂肪酸与 Omega3 脂肪酸在功能上不尽相同，可显著促进 BMSCs 成脂分化。所以，为了进一步探究应对高浓度 Dex 所致的骨髓间充质干细胞凋亡增多、功能下降，我们筛选出了 Omega3 家族的 EPA 与 Omega6 家族的花生四烯酸 (AA, arachidonic acid)。首先，在本研究中我们通过 Annexin V-FITC/PI 染色、透射电镜技术发现，低浓度 (10^{-9} M-- 10^{-7} M) Dex 可促进骨髓间充质干细胞自噬、高浓度 (10^{-6} M) 可显著抑制其自噬、促进其凋亡，且不同浓度的 EPA 可显著挽救高浓度 Dex 导致的 BMSCs 凋亡增加、自噬减少 (图 2-2-2, A-F)。然而，AA 与 EPA 不同，对 Dex 引起的 BMSCs 凋亡与自噬无显著调控作用。具体来说，我们

通过 PI 染色、MTT、Caspase 3 assay、Tunel 染色发现, EPA 可显著改善高浓度 Dex 导致的细胞死亡、并促进细胞增殖活性、减少 Caspase 3 活性且显著减少 Tunel 阳性凋亡细胞的比列 (图 2-2-2, A-E)。为了进一步验证高浓度 Dex 对骨髓间充质干细胞的自噬调控作用, 我们通过透射电镜观察了细胞内部的超微结构。结果显示, 高浓度 Dex 可抑制 BMSCs 自噬小体的形成, 而 EPA 可明显增加自噬小体的形成 (可见明显双层膜结构且里面包绕细胞器) (图 2-2-2, F)。另外, 通过免疫荧光染色与 Western-blot 技术, 我们发现高浓度 Dex 可显著减少骨髓间充质干细胞的自噬标志物 LC3 的表达, 而 EPA 可显著改善此过程, 增加 LC3-2/LC3-1 的比列, 激活细胞保护性自噬反应 (图 2-2-2, G-J)。有趣的是, EPA 对自噬的激活作用并不影响自噬流的形成, 提示自噬形成过程正常 (图 2-2-2, K)。

3.3 二十碳五烯酸可通过提高细胞保护性自噬反应, 从而改善高浓度地塞米松所致的细胞凋亡与骨稳态失衡

前期研究发现, 高浓度 Dex 可促进骨髓间充质干细胞凋亡, 并抑制其自噬。为了阐明自噬与凋亡之间的关系, 我们在 BMSCs 凋亡模型中给予 EPA 干预, 并同时给予自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA) 或自噬激动剂雷帕霉素 (rapamycin, RAPA)。透射电镜显示, RAPA 可进一步增加凋亡后 BMSCs 的保护性自噬反应, 而 3-MA 则抑制自噬小体的形成 (图 2-2-3, A, B)。LC3 的 western blot、RT-PCR、PI 活死细胞染色、Caspase 3 酶活性、MTT 以及 Tunel 染色显示, 进一步增强 BMSCs 的自噬水平可以显著并有效的抵抗 Dex 所致的细胞凋亡, 而抑制自噬反应后, 凋亡进一步加重, 且细胞增殖能力大幅度减弱 (图 2-2-3, C-G)。为了进一步明确自噬在 Dex 诱导 BMSCs 凋亡过程中的作用, 并排除 RAPA 和 3-MA 对其他信号通路的影响, 我们通过 siRNA Knockdown 自噬关键信号分子 Atg7, 并同时给予 Dex 以及 EPA 进行干预。结果显示, 当自噬反应过程受影响后, EPA 将不能在凋亡的 BMSCs 中促进细胞自噬反应, 也无法促进 BMSCs 的增殖 (图 2-2-3, H)。以上结果提示自噬反应可作为细胞凋亡的自身保护机制, 且通过药物干预提升细胞保护性自噬反应, 不仅可减缓细胞凋亡的进程, 也可进一步改善细胞凋亡后对骨代谢平衡紊乱以及骨退行性变的病理进程。

3.4 脂肪酸受体 GPR120(FFAR4)为骨髓间充质干细胞激活保护性自噬反应的关键因子。

为了进一步阐明 EPA 促进 BMSCs 保护性自噬反应的具体分子机理, 我们发现 EPA 的特异性受体 GPR120 通过 siRNA 在 BMSCs 中下调后, 可显著抑制 EPA 的促自噬活性, 下调 LC3-2/LC3/1 的比例, 并且能显著阻断 EPA 对 Dex 诱导的细胞凋亡的保护性作用。有趣的是, EPA 的另一个与 GPR120 结构域相似的受体 GPR40, 在上述过程中并不能发挥作用 (图 2-2-4, A, B)。

为了进一步探究 EPA 以及 GPR120 对骨髓间充质干细胞的体内保护机制, 我们给予 3 月龄成年小鼠高浓度地塞米松诱导, 制造 BMSCs 体内凋亡模型, 并随后在小鼠体内给予 EPA、AA (Oral gavage) 以及 GPR120 特异性激动剂 TUG-891 (Intra-bone marrow cavity) 作用 8 周, 随后提取小鼠骨髓间充质干细胞, 进行凋亡及自噬检测 (图 2-2-5, A)。结果显示, EPA 以及 GPR120 激动剂 TUG-891 可显著增加 BMSCs 的 LC3-2 的水平, Caspase 3 活性与 Tunel 阳性凋亡细胞, 并显著增加细胞活性 (图 2-2-5, B-H)。以上结果提示, EPA 可通过 GPR120 激活 BMSCs 的保护性自噬反应, 从而抑制高浓度 Dex 诱导的细胞凋亡, 从而改善骨髓间充质干细胞的功能与活性。

3.5 中药提取物人参皂苷 Rb2 (Ginsenoside-Rb2) 可通过激活 GPR120, 从而显著改善高浓度地塞米松诱导的骨髓间充质干细胞凋亡, 改善骨稳态

为了进一步探究并完善临床上激素滥用所致骨髓间充质干细胞凋亡以及骨退行性变的治疗方法, 我们在前期研究工作中筛选出了一种重要提取物-人参皂苷 Rb2 (Ginsenoside-Rb2)。人参皂苷 Rb2 可显著提高细胞活性氧成分, 减缓氧化应激所带来的细胞损伤, 从而增加细胞活性。在本实验中, 我们给予骨髓间充质干细胞常规诱导 24h 后, 给予 Dex 与 Rb2 进行诱导。PI 染色、MTT、Caspase 3 assay、Tunel 染色结果显示, 人参皂苷 Rb2 可显著改善高浓度 Dex 导致的细胞凋亡、并促进细胞增殖活性、减少 Caspase 3 活性且显著减少 Tunel 阳性凋亡细胞的比列。机制研究发现, Rb2 可上调骨髓间充质干细胞 GPR120 的表达, 我们通过 siRNA 下调 GPR120 后, Rb2 的抑制凋亡作用显著减弱, 且不能进一步增加细胞的增殖活性。随后, 我

们进一步探讨了 GPR120 抑制凋亡的分子信号通路，通过 GPR120 knock-down BMSCs 并制造 Dex 诱导凋亡模型后，给予 Rb2 进行干预。Western blot 结果显示，人参皂苷 Rb2 可通过 Ras-Erk1/2 信号通路，而不是 Akt, P38,以及 JNK 通路，从而参与调控 BMSCs 的细胞凋亡。

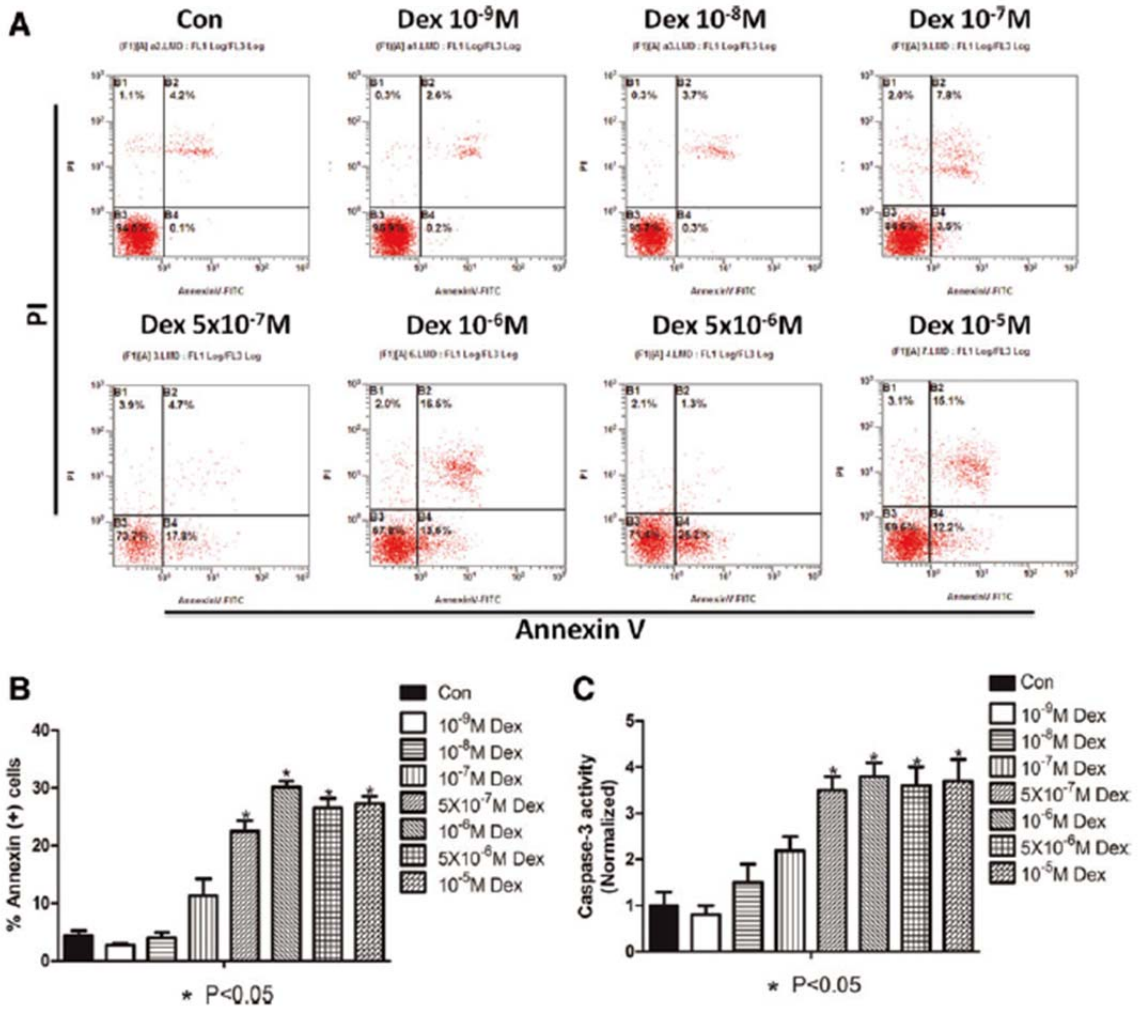


图 2-2-1 高浓度 Dexamethasone (Dex)可诱导小鼠骨髓间充质干细胞发生凋亡

(A-B) Annexin/PI 染色检测不同浓度地塞米松(10⁻⁹ M、10⁻⁸ M、10⁻⁷ M、5x10⁻⁷ M、10⁻⁶ M、5x10⁻⁶ M、10⁻⁵ M)对骨髓间充质干细胞的凋亡效应并统计; Caspase-3 试剂盒检测不同浓度地塞米松(10⁻⁹ M、10⁻⁸ M、10⁻⁷ M、5x10⁻⁷ M、10⁻⁶ M、5x10⁻⁶ M、10⁻⁵ M)对骨髓间充质干细胞的凋亡效应并统计。* *p*<0.05、** *p*<0.01、*** *p*<0.001 代表有统计学差异，NS 代表无统计学差异。

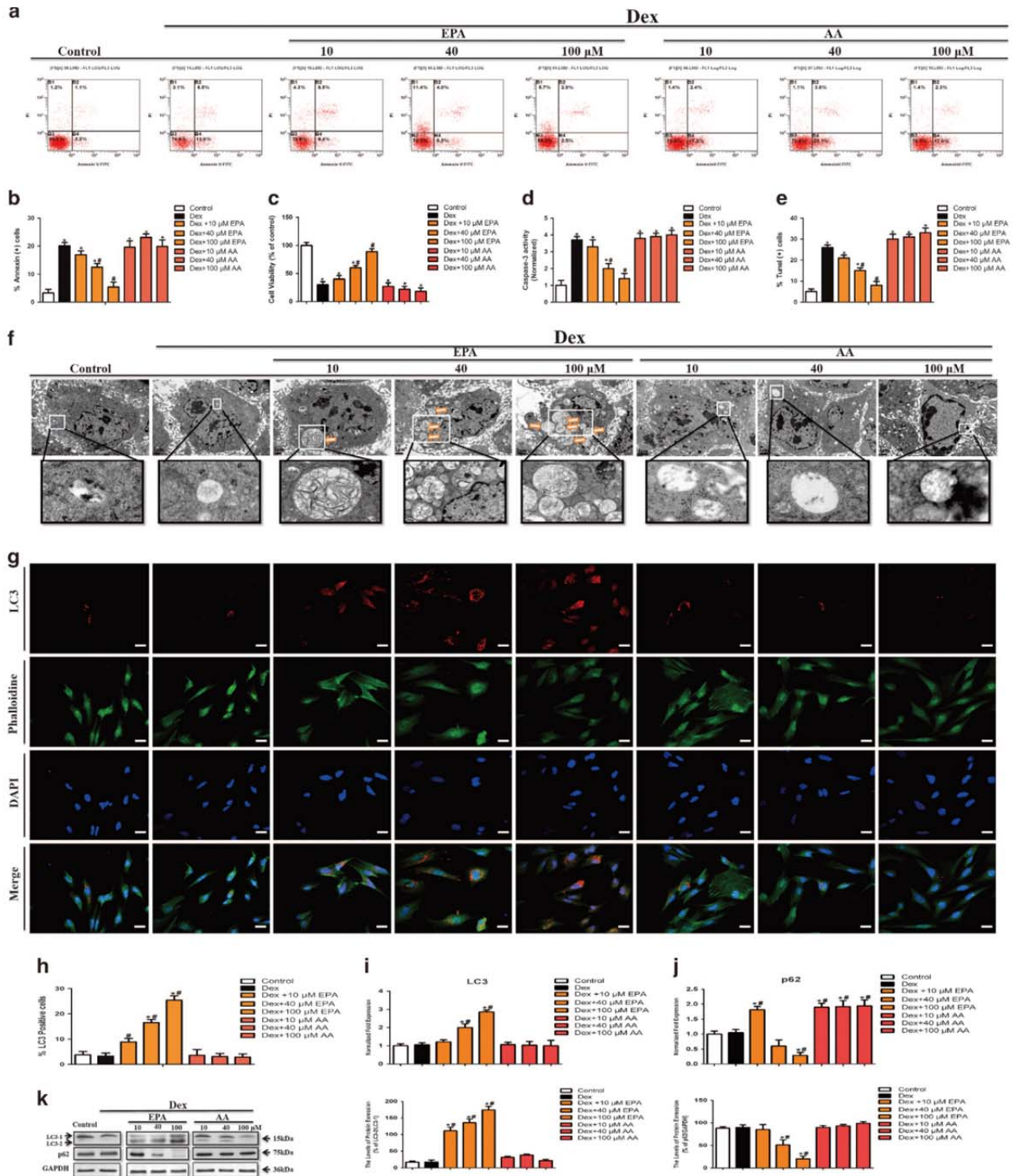


图 2-2-2 EPA 激活 BMSCs 的保护性自噬反应并抑制其凋亡进展，恢复骨稳态失衡
 (A-B) Annexin/PI 染色检测 EPA 或 AA 对 10^{-6} M 地塞米松干预作用下的骨髓间充质干细胞的凋亡情况；(C) MTT 检测细胞活性；(D) Caspase-3 试剂盒检测细胞凋亡；(E) Tumor 免疫化学染色检测细胞凋亡并计数；(F) 透射电镜检测 EPA 或 AA 对 10^{-6} M 地塞米松预作用下的骨髓间充质干细胞的自噬情况；(G-H)LC3 与 Phalloidine 免疫荧光染色检测细胞凋亡并计数；(I-J) RT-PCR 检测骨髓间充质干细胞 LC3 与 P62 的表达情况；(K) Western-blot 检测骨髓间充质干细胞 LC3 蛋白量并计数。 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$ 代表有统计学差异，NS 代表无统计学差异。

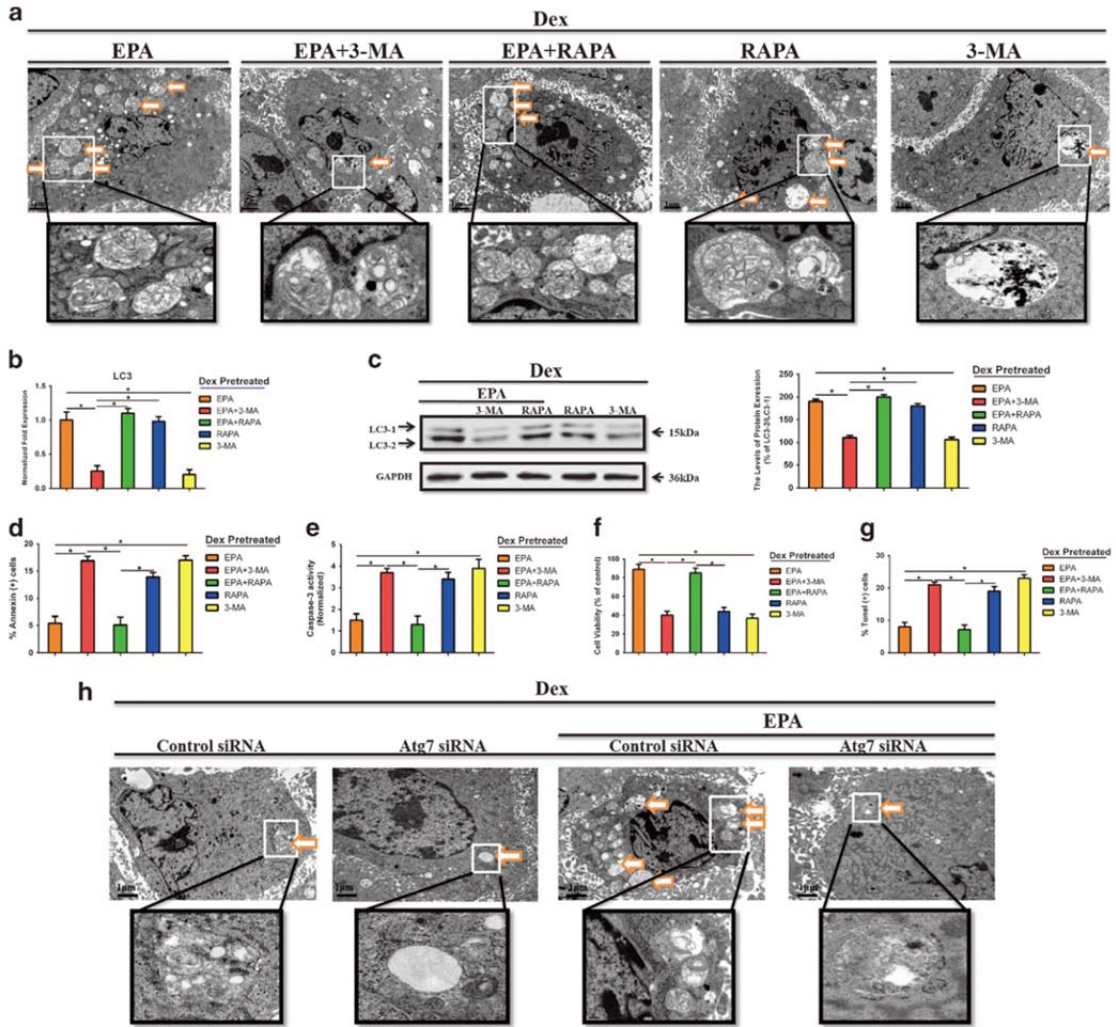


图 2-2-3 BMSCs 的保护性自噬可抑制其凋亡进展，恢复骨稳态失衡

(A-B) 透射电镜检测 EPA、RAPA、3-MA 作用下检测 10^{-6} M 地塞米松对骨髓间充质干细胞的自噬效应并统计；(C) Western-blot 检测骨髓间充质干细胞中 LC3 的蛋白量并统计；(D) Annexin/PI 染色检测骨髓间充质干细胞的凋亡情况；(E) Caspase-3 试剂盒检测细胞凋亡；(F) MTT 检测细胞活性；(G) TUNEL 免疫化学染色检测细胞凋亡并计数；(H) 透射电镜检测骨髓间充质干细胞中 Atg7 knock-down 对 EPA 调控骨髓间充质干细胞的自噬效应。 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$ 代表有统计学差异，NS 代表无统计学差异。

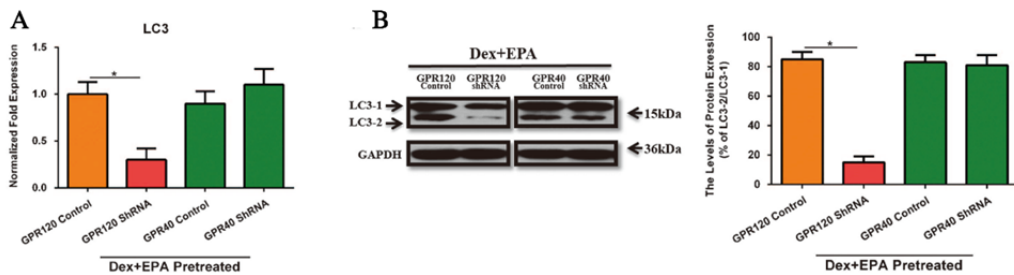


图 2-2-4 脂肪酸受体 GPR120 (FFAR4) 为 BMSCs 激活保护性自噬反应的关键因子

(A) RT-PCR 检测骨髓间充质干细胞在 GPR120 或 GPR40 knock-down 后 LC3 的表达量；(B) Western-blot 检测骨髓间充质干细胞在 GPR120 或 GPR40 knock-down 后 LC3 的蛋白量并计数。 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$ 代表有统计学差异，NS 代表无统计学差异。

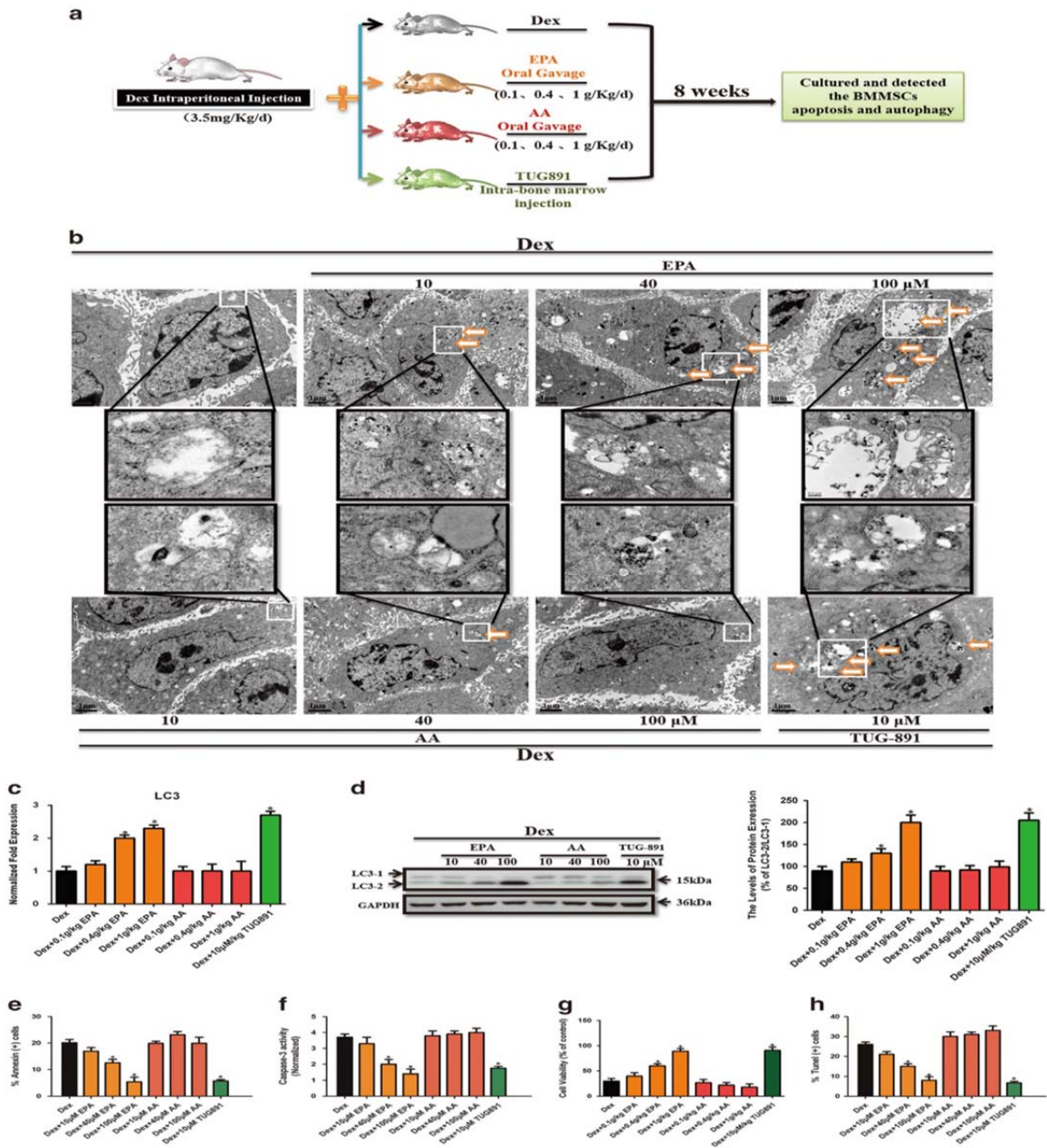


图 2-2-5 体内激活脂肪酸受体 GPR120 可通过激活细胞自噬从而缓解 BMSCs 凋亡。

(A) 激素诱导凋亡小鼠体内注射 EPA、AA 以及 TUG-891 的示意图；(B) 透射电镜检测 EPA、AA 在体内的促自噬效应；(C) RT-PCR 检测骨髓间充质干细胞 LC3 的表达量；(D) Western-blot 检测骨髓间充质干细胞 LC3 的蛋白量；(E) Annexin/PI 染色检测的骨髓间充质干细胞的凋亡情况；(F) Caspase-3 试剂盒检测细胞凋亡；(G) MTT 检测细胞活性；(H) TUNEL 免疫化学染色检测细胞凋亡并计数。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 代表有统计学差异，NS 代表无统计学差异。

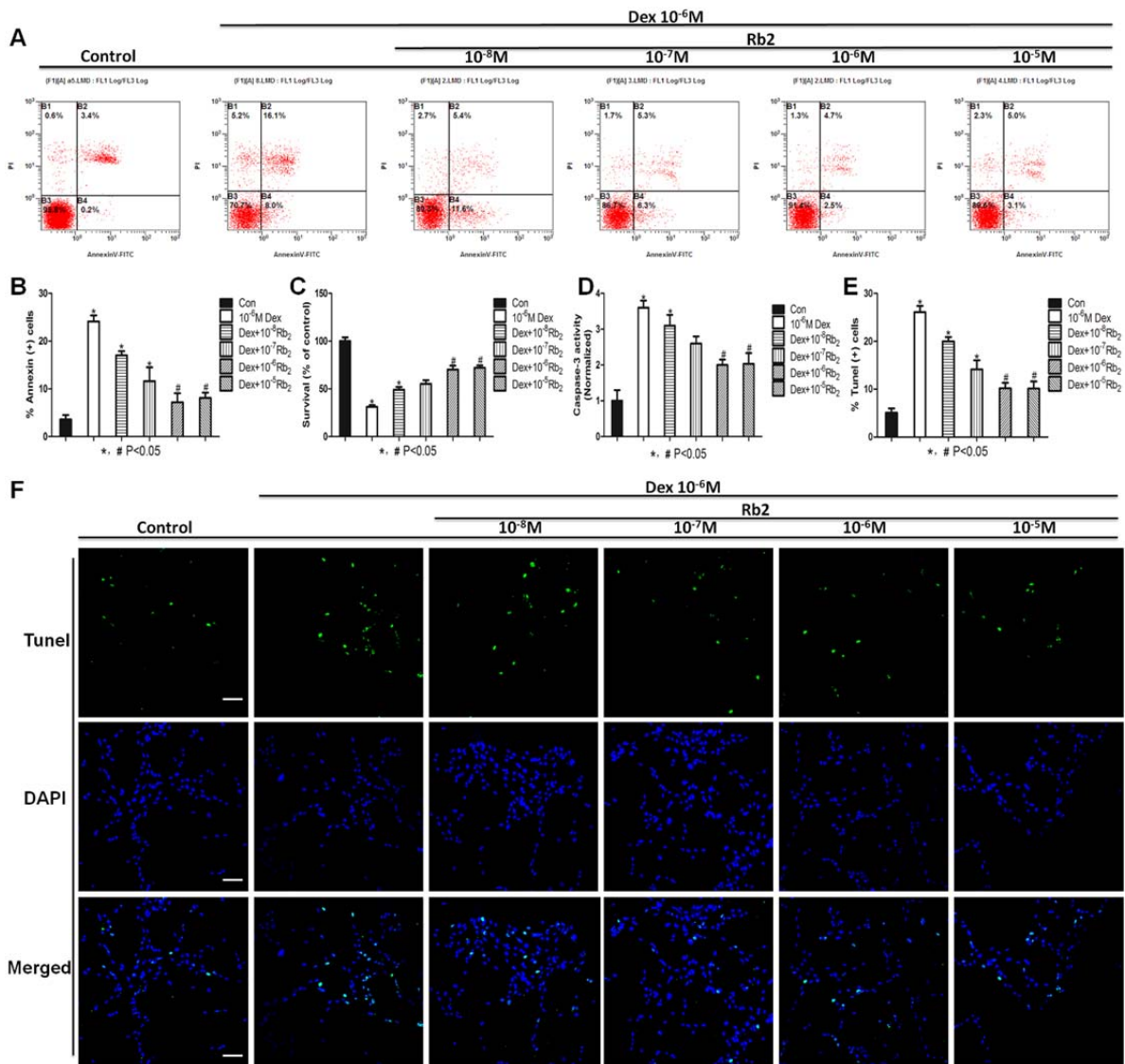


图 2-2-6 人参皂苷 Rb2 改善高浓度地塞米松诱导的 BMSCs 凋亡

(A-B) Annexin/PI 染色检测 Rb2 对不同浓度地塞米松干预作用下的骨髓间充质干细胞的凋亡情况；(C) MTT 检测细胞活性；(D) Caspase-3 试剂盒检测细胞凋亡；(E-F) TUNEL 免疫化学染色检测细胞凋亡并计数；* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 代表有统计学差异，NS 代表无统计学差异。

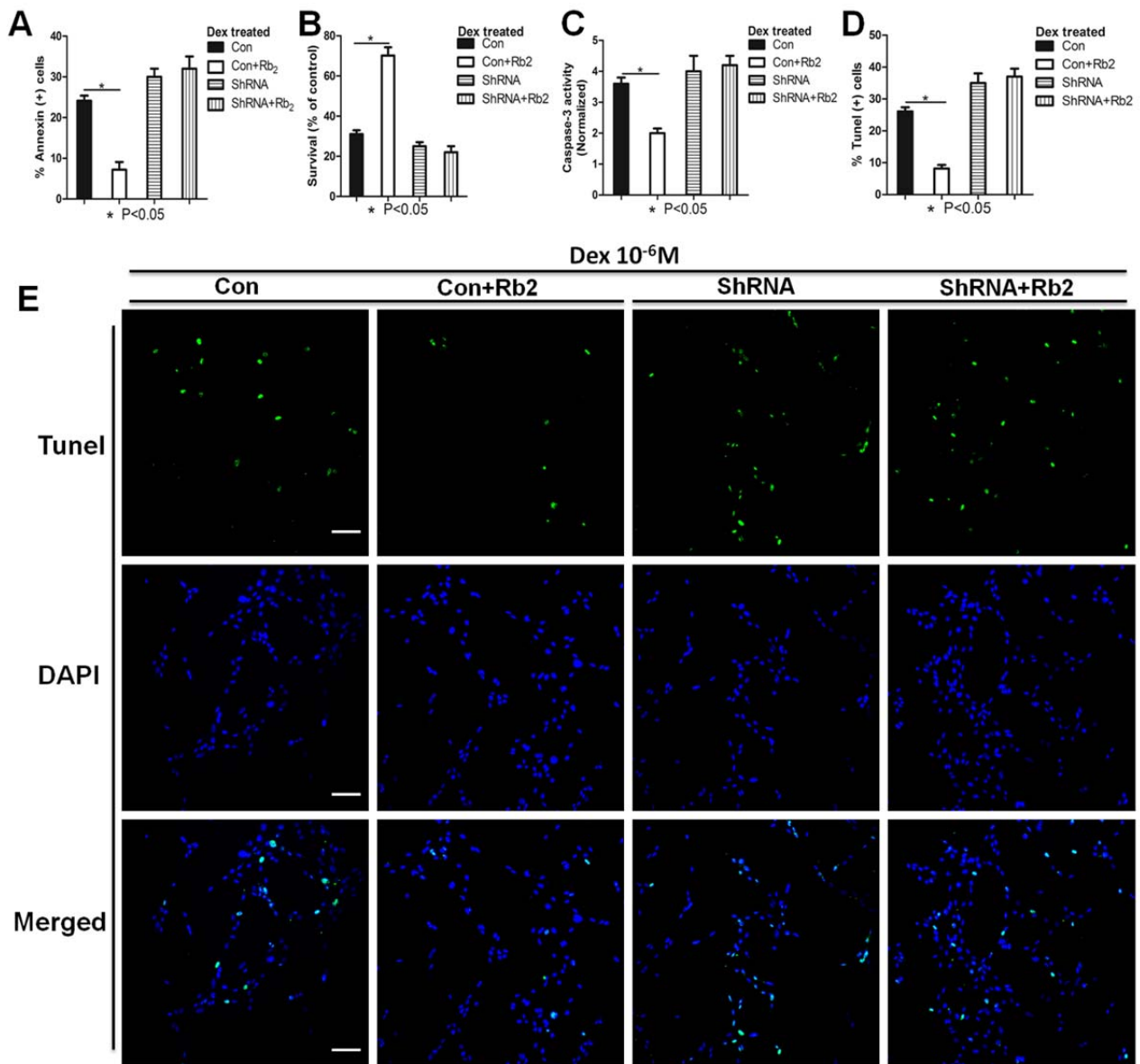


图 2-2-7 人参皂苷 Rb2 通过激活脂肪酸受体 GPR120 (FFAR4)抑制 BMSCs 凋亡

(A) 激素诱导凋亡小鼠体内注射 Rb2 对不同浓度地塞米松干预及 GPR120 敲除作用下的骨髓间充质干细胞的凋亡情况；(B) MTT 检测细胞活性；(C) Caspase-3 试剂盒检测细胞凋亡；(D-E) TUNEL 免疫化学染色检测细胞凋亡并计数；* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、*** $p<0.001$ 代表有统计学差异，NS 代表无统计学差异。

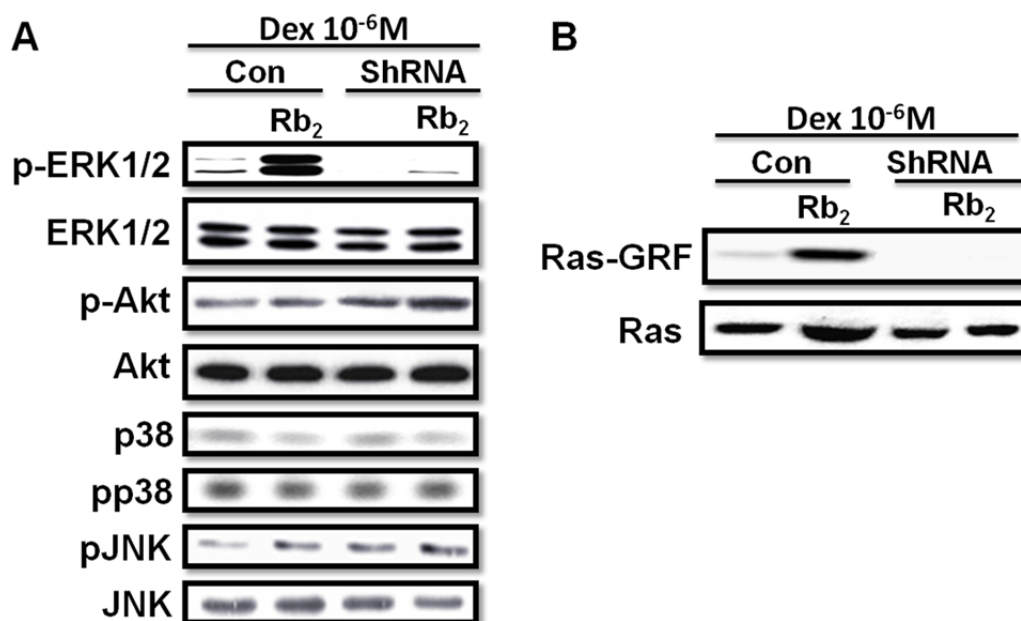


图 2-2-8 人参皂苷 Rb₂ 通过 GPR120-Ras-Erk1/2 信号通路从而抑制 BMSCs 凋亡

(A) Western-blot 检测骨髓间充质干细胞中 Erk1/2, Akt, P38, and JNK 的总蛋白及磷酸化蛋白水平; (B) Western-blot 检测骨髓间充质干细胞中 Ras 及 Ras-GRF 的蛋白水平。

4 讨论

骨髓间充质干细胞的增殖、凋亡与自噬是此部分关注的重点。在生理条件下，骨髓间充质干细胞处于相对静止状态，位于干细胞“巢”内并持续进行自我更新。当细胞受到外界干预因素与内部的新老交替时，细胞会发生保护性的自噬反应，通过清除代谢废物以及“有毒物质”，从而维持自身正常的功能状态。当干预因素过强或者保护性自噬反应受损时，细胞功能将进一步受损，出现程序性细胞死亡或不可逆性的细胞死亡。然而，自噬与凋亡的关系尚未阐明，尤其在骨髓间充质干细胞中，BMSCs 的自噬反应与凋亡是否存在直接调控关系？BMSCs 的自噬是否可直接导致细胞程序性死亡？抑或自噬可以抑制细胞发生程序性死亡都不得而知。在骨稳态失衡以及骨退行性变过程中，骨微观结构被破坏，骨髓腔内微环境改变，骨髓间充质干细胞功能破坏，进一步加重骨稳态失衡。我们知道，骨髓间充质干细胞是维持全身骨量以及骨髓内微环境的重要因素之一，如果其遭受凋亡或者自噬后不能维持其自身生理功能，那么全身骨量以及髓内微环境将不可避免的受到影响。

在本研究中，我们通过糖皮质激素（地塞米松）诱导骨髓间充质干细胞凋亡。目前，临床上广泛应用激素治疗全身性炎症反应或者部分疾病的急性期进展，然而高浓度地塞米松以及其他糖皮质激素滥用可导致全身多系统的副作用，其中，骨骼系统的不良反应包括 BMSCs 向 Adipocyte-lineage Cell 分化以及后续的 Programmed Cell Death，导致骨骼系统的稳态失衡以及退行性变如股骨头坏死、骨质疏松以及骨关节炎的进展。所以，阐明并理清骨髓间充质干细胞凋亡的具体机制，以及其保护性自噬反应在凋亡发生与进展过程中的调控机制至关重要。尤其是找到安全、特异、有效的治疗措施，对于靶向骨髓间充质干细胞凋亡从而改善骨稳态失衡与骨退行性变有着重要的意义。在本研究中我们发现，高浓度地塞米松不仅可以诱导 BMSCs 的凋亡，也可同时抑制 BMSCs 的保护性自噬反应，提示凋亡与自噬可能存在相关性。有研究表明，脂肪酸家族及其受体可以显著促进细胞的增殖活性，并通过激活多种信号通路，从而改善细胞中的活性氧成分以及线粒体功能。因此，我们筛选出了 Omega 3 脂肪酸家族的 EPA 与 Omega 6 脂肪酸家族的 AA，并探讨其在 Dex 诱导 BMSCs 凋亡中的保护性作用。透射电镜、LC3 免疫荧光与 Western blot 结果皆证实，EPA 而不是 AA，可以显著刺激细胞产生保护性自噬反应，并缓解高浓度 Dex 诱导的凋亡作用。进一步机制研究表明，EPA 可通过上调 BMSCs 表面的 GPR120，从而激活下游 mTOR 信号通路，从而诱导细胞保护性自噬反应，体内实验中也进一步证实此发现。有趣的是，当我们用自噬阻断剂 3-MA 或者 Atg 7 knock-down siRNA 阻断 EPA 诱导的保护性自噬反应后，细胞的凋亡水平大幅度上升，且 EPA 的治疗作用明显消失。上述结果提示，EPA 激活的自噬反应可显著缓解 BMSCs 发生的程序性细胞死亡，从根本上改善细胞的增殖活性，改善细胞功能。当骨稳态失衡中的 BMSCs 功能逐渐恢复后，将不同程度的逆转骨退行性变过程、恢复骨稳态。

在课题组前期研究中发现，人参中的提取物人参皂苷 Rb2 可以通过增加骨髓间充质干细胞内的活性氧成分，抑制细胞氧化应激反应，并显著逆转骨质疏松后的骨量丢失以及微观环境改变。在本研究中我们通过使用人参皂苷 Rb2，从多角度阐明了其对糖皮质激素滥用所导致的骨髓间充质干细胞功能受损的治疗作用。由于 Rb2 的无毒性以及广谱性，其临床应用价值持续受到关注。在本研究中，我们通过体外培养高浓度地塞米松提前处理过的 BMSCs，并给予不同浓度的 Rb2 进行干预。通

过 Tunel 染色、流式细胞学 PI 染色以及免疫荧光染色，我们发现 Rb2 可显著抑制高浓度 Dex 诱导的 BMSCs 凋亡。进一步研究发现，Rb2 可通过激活 GPR120，从而激活其下游的 Ras-Erk1/2 信号通路，改善细胞内环境，促进 Cell Proliferation，抑制 Cell Apoptosis。

骨髓间充质干细胞对骨骼系统的构建以及骨稳态的维持起到至关重要的作用，其凋亡与自噬的动态失衡将导致其功能活性下降，诱导多种病理过程并序惯性的引起骨退行性变的发生，从而引起骨稳态失衡。通过找到 BMSCs 凋亡与自噬过程中的共调控因子，并以此作为靶点筛选出特异性的治疗方案意义重大。在今后的研究中，我们将进一步通过多种模式动物以及疾病模型，并筛选出针对于 BMSCs 凋亡与自噬的共调控靶点进行干预，从根本上改善 BMSCs 的功能，从而逆转骨退行性变的进程并改善骨稳态失衡。

实验三 骨髓间充质来源干细胞的成骨-成脂分化偶联 在骨稳态与骨退行性变中的作用

1 材料

1.1 仪器设备

CO ₂ 细胞培养箱	Thermo, Germany
超净台	吴江市净化设备总厂, 中国江苏
4℃离心机	Healforce 公司, 中国上海
450 酶标仪	Biorad, USA
BCA 蛋白定量仪	Biorad, USA
蛋白电泳仪	Biorad, USA
共聚焦显微镜	Olympas, USA
水浴箱	上海兰凯仪器仪表有限公司, 上海
振荡器	苏州安创仪器有限公司, 江苏
450 酶标仪	Biorad, USA

1.2 实验动物与试剂

C57 小鼠	空军军医大学实验动物中心
DF12 培养基	Gibco, USA
胰蛋白酶	Gibco, USA
多聚甲醛	天津红岩
青链霉素	Sigma-Aldrich, USA
MC3T3-E1	ATCC, USA
MC3T3-L1	ATCC, USA
17 β -雌二醇	Sigma-Aldrich, USA
鬼笔环肽罗丹明染液	Cytoskeleton, USA
胎牛血清	Gibco, USA

单克隆兔抗大鼠 p62 抗体	Cell Signaling Technology, USA
Triton X-100	MP, USA
MTT	MP, USA
5-Brdu	MP, USA
DAPI	MP, USA
正常山羊血清封闭液	博士德公司, 中国
DMEM 高糖培养基	Hyclone, USA

2 方法

2.1 小鼠卵巢切除术

- 1) 用提前至备好的麻醉药品经腹腔注射入 C57 小鼠体内, 进行常规麻醉。麻醉药品为 1%戊巴比妥钠, 剂量为 50mg/kg。
- 2) 将小鼠置于手术操作台上, 使小鼠置于俯卧位, 固定后充分暴露术野, 用小鼠去毛器于肋缘下 1cm, 脊椎旁 2cm 处剔除毛发, 并使用碘伏进行术野消毒。通过镊子钝性分离腰背部肌肉, 通过显微镜顺着输卵管观察两侧卵巢和对称相联的子宫角。
- 3) 用无齿镊小心提拉脂肪组织, 沿子宫角上侧与输卵管近子宫端剪断子宫角, 之后在显微镜下摘除卵巢, 检查出血情况后将背部肌肉层与腹膜层逐一缝合, 确定无空隙后通过单纯间断缝合方式闭合皮肤。将取下的卵巢称重, 并拍照。
- 4) 术后 48h 给予青链霉素抗感染, 并在 8 周后扫描 Micro-CT, 确定造模成功。

2.2 小鼠显微 CT 分析

显微 CT 中所处理样本与设置参数同实验一与实验二部分。

2.3 骨髓间充质干细胞的提取

将不同分组 3 月龄成年小鼠分别置于超净台上, 将脱颈处死小鼠置于 70%酒精中 4-8 min。仔细分离小鼠股骨和胫骨, 充分去除骨面上附着的肌肉、脂肪和韧带等。剪去两端干骺端。用注射器吸取无血清培养液充分冲洗骨髓腔, 重复 2-3 次。使用滴管将收集的冲洗液直接接种于 15ml 离心管中, 进行随后的流式细胞学筛选及鉴定。

2.4 成骨细胞碱性磷酸酶活力检测

碱性磷酸酶试剂盒可快捷、迅速的检测细胞或组织的裂解液中存在的内源性的碱性磷酸酶活力的试剂盒。本实验中，取 BMSCs 接种到六孔板中(5×10^4 个/孔)，并用 DMEM 高糖配置的成骨分化培养基对 BMSCs 成骨诱导 21 天后，用 RIPA 裂解液充分裂解 BMSCs 分化的成骨细胞，随后用高速离心机以 12000 r/min 的转速离心 5 min。取上清液检测 ALP 活力。

ALP 活力试剂盒组成成分

产品名称	包装
检测液	15ml
Labeling Buffer	2 tubes
P-nitrophenol Solution(10 mM)	0.1ml
Termination buffer	12ml

① 试剂准备:

- 1) Labeling Buffer: 将显色的 Base solution 在 2.5ml 的 Labeling buffer 中完全溶解，混匀后放置于冰上。原则上遵循现配现用。
- 2) Standard Working Solution: 用检测液将 10 μ 的 p-nitrophenol 溶液(10mM) 稀释至 0.2ml，溶液的 Final Concentration 为 0.5mM。

② 样品准备:

- 1) Cell Lysis Buffer 的准备: 用 Cell Lysis Buffer 对骨髓间充质干细胞诱导后的成骨细胞进行裂解，充分混匀后在高速离心机上以 1200r/min 进行离心操作，取上清液用于碱性磷酸酶活性的测试。

- ③ 按照说明书里的 protocol 往孔板中加样。对于 Standard Sample，我们将用量设置为 4、8、16、24、32 与 40 μ l，标准样品则直接加入 50 μ l。

碱性磷酸酶活力测试中的加样参考

	Vehicle Control	Standard Sample	Sample
Testing Buffer	50 μ l	(100-x) μ l	(50-y) μ l
Developing Substrate	50 μ l	—	50 μ l
Sample	—	—	y μ l
Standard Solution	—	x μ l	—

④ 加样并将样品和标准样品混匀, 37℃ 孵育 10min。完成孵育后给予每孔 100 μ l termination buffer 终止交联反应。设置波长在 405nm 并测定吸光度。依据碱性磷酸酶活力单位的定义, 可计算出各个组中碱性磷酸酶的活力。

2.6 成骨钙质沉积检测及定量

将骨髓间充质干细胞诱导的成骨细胞接种到六孔板中(1×10^5 个/孔), 加入成骨诱导液进行成骨分化 21 天。具体染色过程及实验方法如下:

- ①用 4%多聚甲醛在 4℃ 条件下固定骨髓间充质干细胞来源的成骨细胞 15 分钟。
- ②用 PBS 洗涤三遍, 每次 5min。然后在室温条件下, 用 Alizarin Red S 染液孵育细胞 30min。
- ③用 PBS 洗涤三遍, 每次 5min。在显微镜下根据不同倍数观察呈紫红色的钙结节, 选取不同视野计数后拍照。
- ④拍照计数后, 用 PBS 洗掉未充分结合的染液并检测基质钙化能力。
- ⑤通过 10%的 Cetylpyridinium Chloride 充分溶解钙质结节 15min。
- ⑥将溶解的溶液, 加入 96 孔板中, 并用酶标仪在波长 562nm 处测定吸光度 OD 值。

2.7 骨髓间充质干细胞成脂肪分化

取 2.3 所筛选细胞, 接种于六孔板中进行常规细胞培养(1×10^5 个/孔), 待细胞铺满至孔板底面 70%左右后, 使用成脂分化诱导液 (10 mM 地塞米松, 5 mg/ml 胰岛素, and 0.5 mM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤溶于 10%高糖 DMEM 培养基中), 进行 14 天成脂分化诱导; 并通过油红 O 染色确定脂肪分化及脂滴形成情况。

2.8 慢病毒转染细胞

- 1) 慢病毒 (shRNA) 转染过程前, 将所需的各组细胞以 4×10^5 /孔均匀铺至 24 孔板中, 在适宜的培养条件下, 让细胞数量稳定增长, 并在转染前将细胞数量扩增至 1×10^6 /孔左右。
- 2) 转染慢病毒时, 用含有 8 μ g/ml gene transfection 增强因子的培养基常规换液, 并加入提前配置好的病毒悬液, 在培养箱中孵育并培养 24h 后, 换为常规培养基, 注意动作轻柔, 避免污染。
- 3) 继续常规培养, 隔天换液, 3-4 天后加入 puromycin 进行筛选。

2.9 统计分析

所得数据利用 SPSS19.0 软件进行统计学单因素方差分析(one-way ANOVA)进行组间比较,以 Bonferroni 进行两两互相比,统计数据呈现为均数 \pm 标准差($\bar{X} \pm \text{SD}$), $p < 0.05$ 为具有显著统计学差异。

3 结果

3.1 骨髓间充质干细胞的成骨分化与成脂分化相互偶联

前期研究发现,在骨质疏松、骨衰老等骨骼退行性变中,骨髓腔中髓内脂肪大量蓄积,其主要原因为骨髓间充质干细胞成骨分化减少、成脂分化增强,而主要调控因素为雌激素缺失导致。在本研究中,我们率先发现骨髓间充质细胞分化形成的成骨细胞在特定条件下可直接向脂肪细胞转分化,提示成骨分化与成脂分化存在偶联关系。通过建立绝经后骨质疏松模型,并提取骨髓间充质干细胞体外常规培养 3 代后,给予骨髓间充质干细胞成骨诱导 7 天,在此基础上更换为成脂诱导培养基继续诱导 7 天或 14 天并同时添加不同浓度的 17β -雌二醇。碱性磷酸酶染色与茜素红染色结果显示,骨髓间充质干细胞在成骨诱导后可分化为成骨细胞,而成骨细胞在成脂培养基中诱导后,碱性磷酸酶及钙结节形成能力显著下降(图 2-3-1, A-D)。有趣的是,骨质疏松后的骨髓间充质干细胞成骨-成脂转分化显著增强,且 17β -雌二醇可抑制 BMSCs 的成骨-成脂转分化,减少髓内脂肪形成,提示其抑制髓内脂肪的潜在效应(图 2-3-1, A-E)。油红 O 染色进一步证实,骨质疏松情况下,骨髓间充质干细胞不仅成脂肪分化增加,其成骨后向脂肪细胞直接转分化作用也显著增强,提示成骨-成脂相互偶联(图 2-3-2, A,B)。

3.2 脂代谢产物-脂肪酸可通过其受体 GPR120 调控干细胞成骨-成脂双向分化, GPR120 是骨髓间充质干细胞成骨分化的关键调控因子。

在生理条件下,骨髓间充质干细胞的成骨分化与成脂分化偶联平衡。当骨质疏松发生时, BMSCs 的成骨分化减弱、成脂分化增强,加重骨稳态失衡。为了阐明 BMSCs 成骨-成脂偶联机制,我们在前期研究中探究了脂代谢的生理过程,发现脂代谢产生的脂肪酸对细胞的功能维持至关重要。随后我们鉴定出 BMSCs 高度表达

脂肪酸受体 GPR120。通过使用 GPR120 特异性激动剂 TUG-891 后,我们发现 BMSCs 的碱性磷酸酶水平与矿化结节形成能力显著增强 (图 2-3-3, A-D), 且成骨相关因子如 Alp, Runx2 和 Ocn 的表达增加 (图 2-3-3, E)。随后,我们通过 shRNA knock-down GPR120 后,发现 BMSCs 成骨能力显著下降。RT-PCR 进一步证实,下调 GPR120 后可抑制 BMSCs 的 Alp, Runx2 和 Ocn 基因表达(图 2-3-3, E)。

3.3 GPR120 可通过剂量依赖性效应, 激活不同的 Integrin 家族, 从而调控成骨-成脂偶联。

由于 GPR120 在前期研究中被认为是“新型的肥胖预测因子”, 且作为脂肪代谢产物脂肪酸的受体, 广泛参与成脂分化过程, 我们希望阐明 GPR120 在 BMSCs 成骨-成脂偶联中的作用。通过使用剂量梯度的 GPR120 激动剂 TUG-891 (0, 0.1, 0.5, 1, 5 μ M) 对 BMSCs 诱导后, 使用碱性磷酸酶与钙结节染色以及 RT-PCR 验证其成骨效应。有趣的是, 我们发现 GPR120 呈剂量依赖性的调控 BMSCs 成骨-成脂偶联。具体来说, 高浓度 TUG-891 可显著促进 BMSCs 成骨分化 (图 2-3-4, A-E), 而低浓度 TUG-891, 尤其是 0.5 μ M, 显著抑制其碱性磷酸酶活性以及钙结节的形成 (图 2-3-4, B,D), 并抑制成骨相关基因如 Alp, Runx2 和 Ocn 的表达(图 2-3-4, E)。

进一步通过油红 O 染色表明, 低浓度 TUG-891 可显著促进 BMSCs 向脂肪细胞分化, 并上调脂肪细胞相关因子 Pparg 和 Fabp4 的表达 (图 2-3-5, A-C), 提示 GPR120 可调控 BMSCs 成骨、成脂双向分化, 但具体机制尚不明了。进一步机制研究发现, 不同剂量的 TUG-891 可激活不同的 Integrin 家族, 从而引发不同的生物学效应。具体来说, 高浓度 TUG-891 可激活 Integrin $\alpha 1\beta 1$ 和 $\alpha 2\beta 1$, 从而上调下游 Ras-Erk 信号通路, 促进 BMSCs 向成骨分化; 而低浓度 TUG-891 可激活 Integrin $\alpha v\beta 3$, 从而上调下游 p38 信号通路, 促进 BMSCs 向脂肪分化 (图 2-3-6, A-C)。

3.4 骨质疏松条件下骨髓间充质干细胞成骨-成脂偶联失衡, 而体内激活 GPR120 可显著改善偶联失衡, 促进骨稳态。

前期研究中已在体外证实了 GPR120 可双向调控 BMSCs 成骨-成脂分化平衡。为了进一步证实 GPR120 可在体内通过剂量依赖效应调控此过程, 我们首先构建了绝经后骨质疏松模型, 并在造模基础上给予不同浓度的 TUG-891 干预, 10 周后取

材。Micro CT 与 VG 染色结果显示, 高浓度 TUG-891 可显著改善骨质疏松导致的骨量丢失, 增加骨密度、骨量、骨厚度以及骨连接距离; 而低浓度则无显著效果 (图 2-3-7, A-K)。荧光双标结果进一步证实, 高浓度 TUG-891 可显著促进骨形成率和矿化沉积率, 改善成骨成脂偶联失衡, 促进骨稳态 (图 2-3-7, L); 然而, 低浓度 TUG-891 对骨质疏松后的骨稳态失衡无明显调控作用 (图 2-3-7, A-L)。

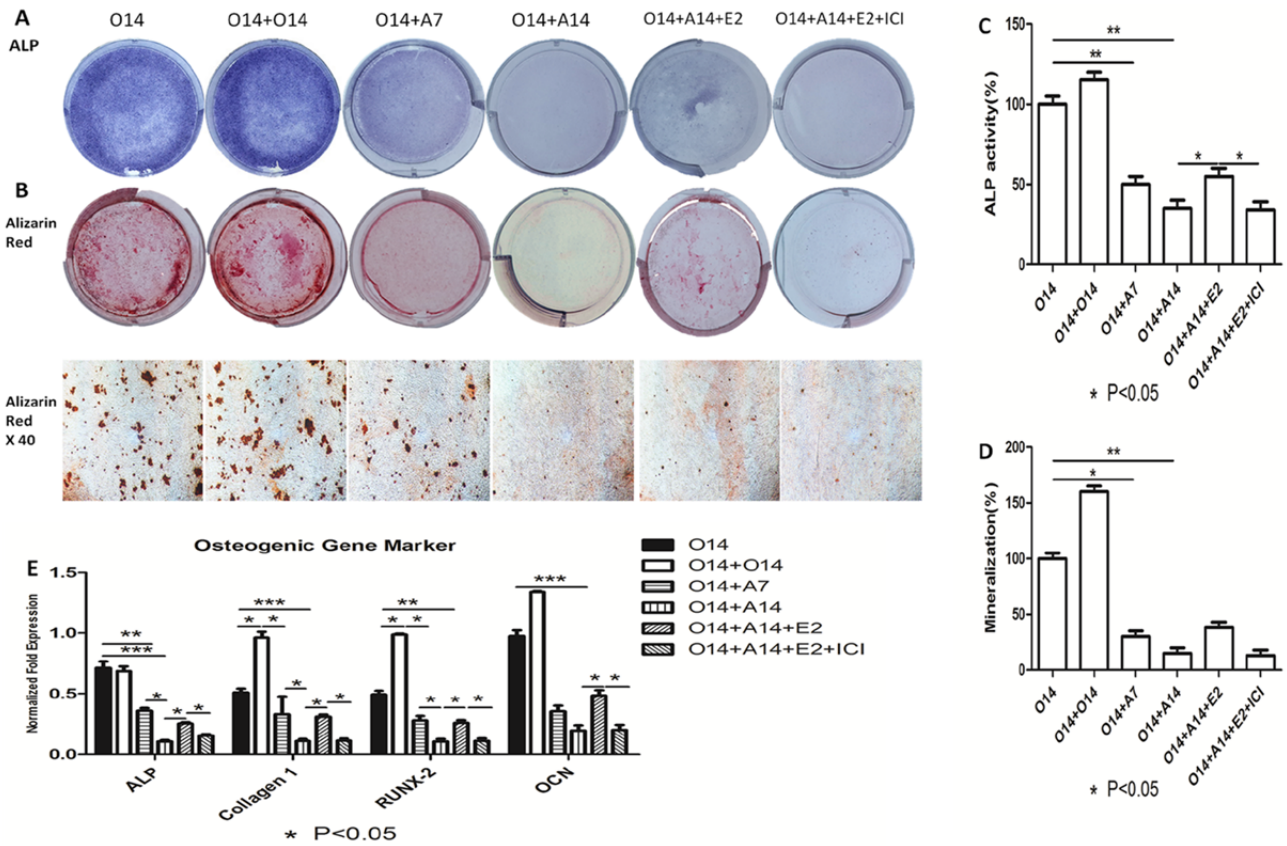


图 2-3-1 骨髓间充质干细胞的成骨分化与成脂分化相互偶联

(A) 成骨碱性磷酸酶(ALP)染色; (B) 成骨茜素红(Alizarin Red)染色; (C) ALP 染色定量; (D) Alizarin Red 染色定量; (E) RT-PCR 检测骨髓间充质干细胞成骨-成脂偶联过程中 Alp、Collagen1、Runx2 以及 Ocn 表达量。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 代表有统计学差异, NS 代表无统计学差异。

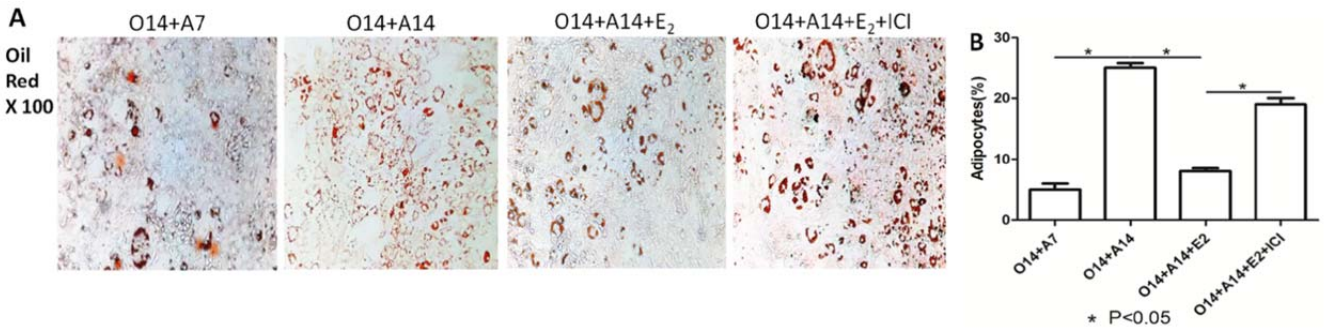


图 2-3-2 骨髓间充质干细胞的成骨-成脂转分化现象

(A) 油红 O(Oil Red O)染色; (B) 油红 O 染色定量。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 代表有统计学差异, NS 代表无统计学差异。

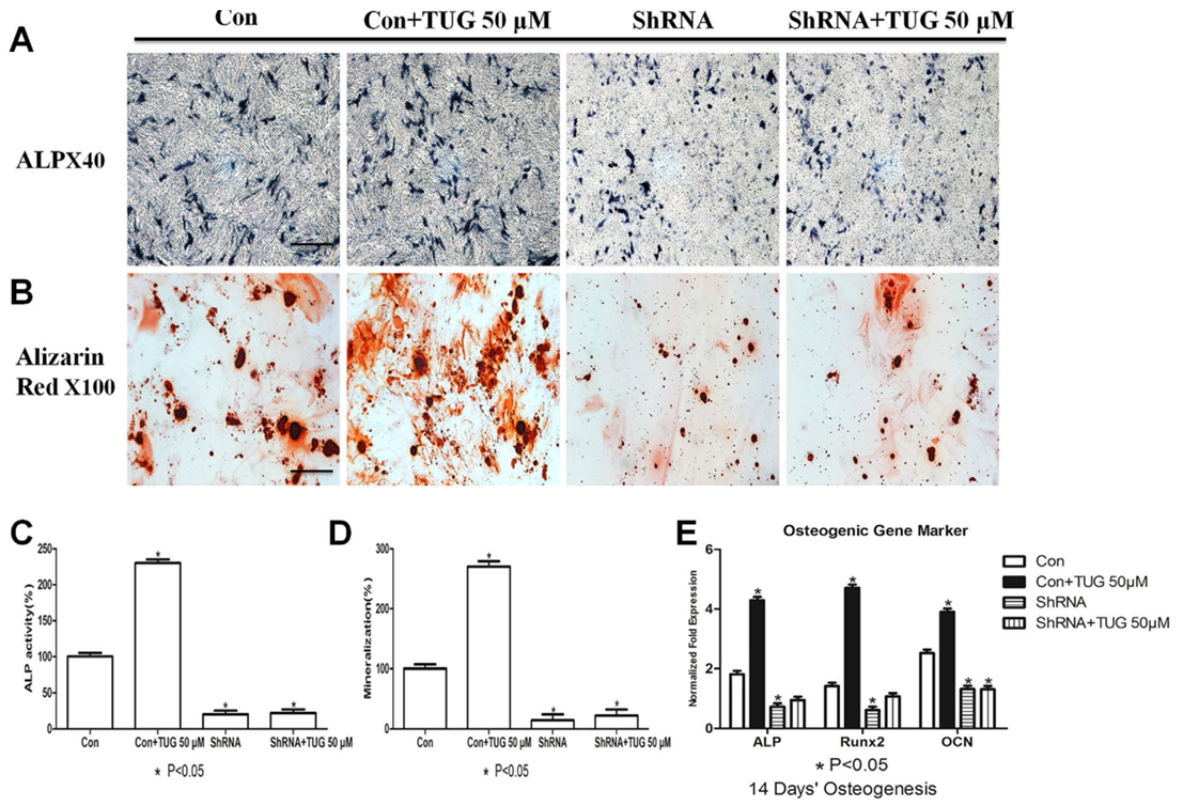


图 2-3-3 脂肪酸受体 GPR120 调控骨髓间充质干细胞成骨-成脂双向分化

(A) 成骨碱性磷酸酶(ALP)染色; (B) 成骨茜素红(Alizarin Red)染色; (C) ALP 染色定量; (D) Alizarin Red 染色定量; (E) RT-PCR 检测骨髓间充质干细胞成骨-成脂偶联过程中 Alp、Collagen1、Runx2 以及 Ocn 表达量。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 代表有统计学差异, NS 代表无统计学差异。

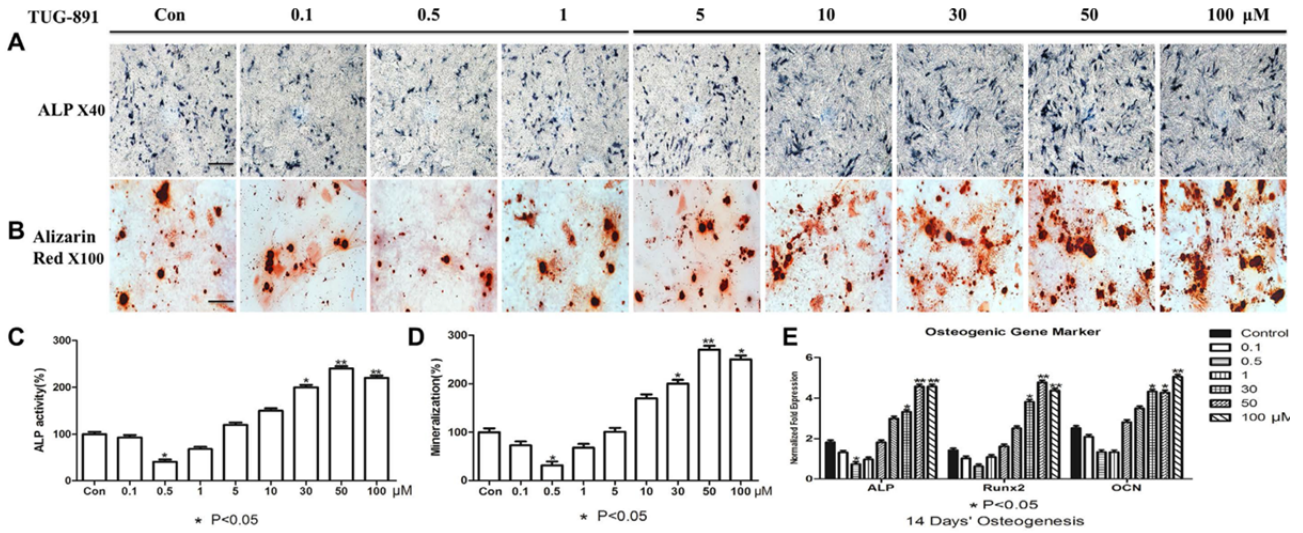


图 2-3-4 脂肪酸受体 GPR120 调控骨髓间充质干细胞成骨-成脂双向分化

(A) 成骨碱性磷酸酶(ALP)染色; (B) 成骨茜素红(Alizarin Red)染色; (C) ALP 染色定量; (D) Alizarin Red 染色定量; (E) RT-PCR 检测骨髓间充质干细胞成骨-成脂偶联过程中 Alp、Collagen1、Runx2 以及 Ocn 表达量。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 代表有统计学差异, NS 代表无统计学差异。

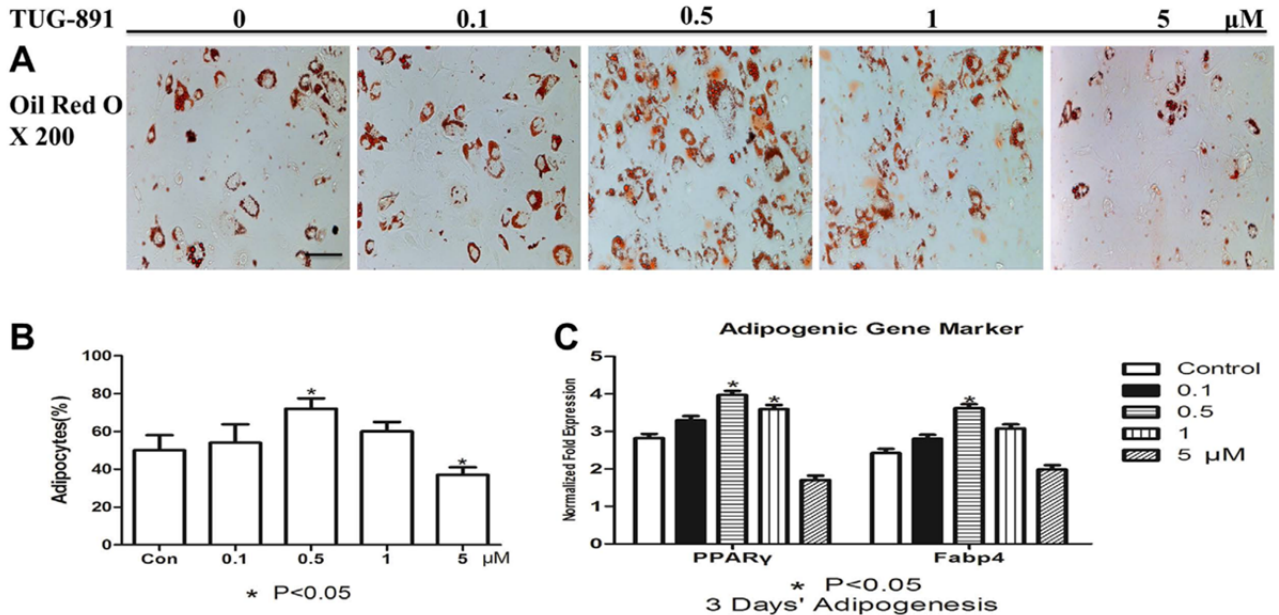


图 2-3-5 低浓度 GPR120 激动剂-TUG891 促进骨髓间充质干细胞成脂分化

(A) 油红 O(Oil Red O)染色; (B)油红 O 染色定量。RT-PCR 检测骨髓间充质干细胞成骨-成脂偶联过程中 Ppar γ 与 Fabp4 的表达量。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 代表有统计学差异。

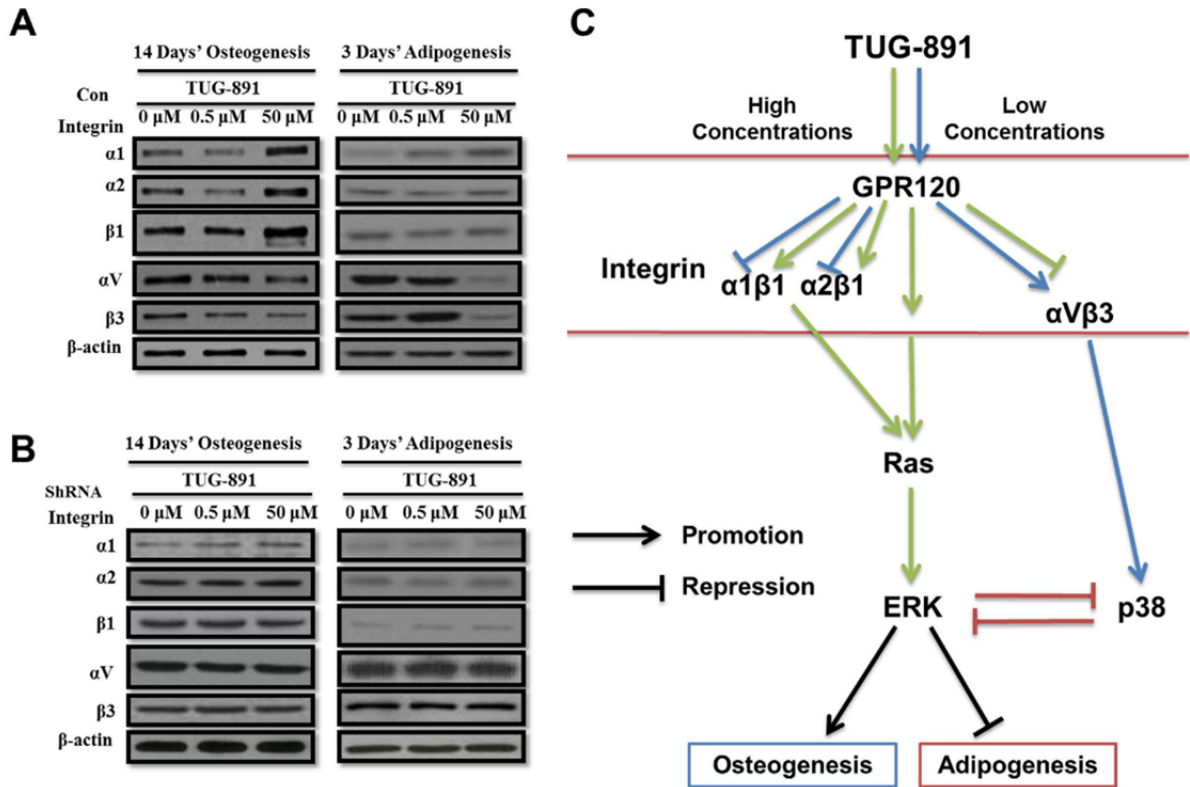


图 2-3-6 脂肪酸受体 GPR120 可激活下游不同的 Integrin 家族亚基，从而调控骨髓间充质干细胞成骨-成脂偶联

(A) Western-blot 检测不同浓度 GPR120 激动剂 TUG-891 作用下骨髓间充质干细胞中多种 Integrin 亚基的蛋白量；(B) Western-blot 检测不同浓度 GPR120 激动剂 TUG-891 作用下骨髓间充质干细胞在敲除 GPR120 后多种 Integrin 亚基的蛋白表达量；(C) GPR120 激活下游不同 Integrin 家族亚基从而调控成骨-成脂偶联示意图。

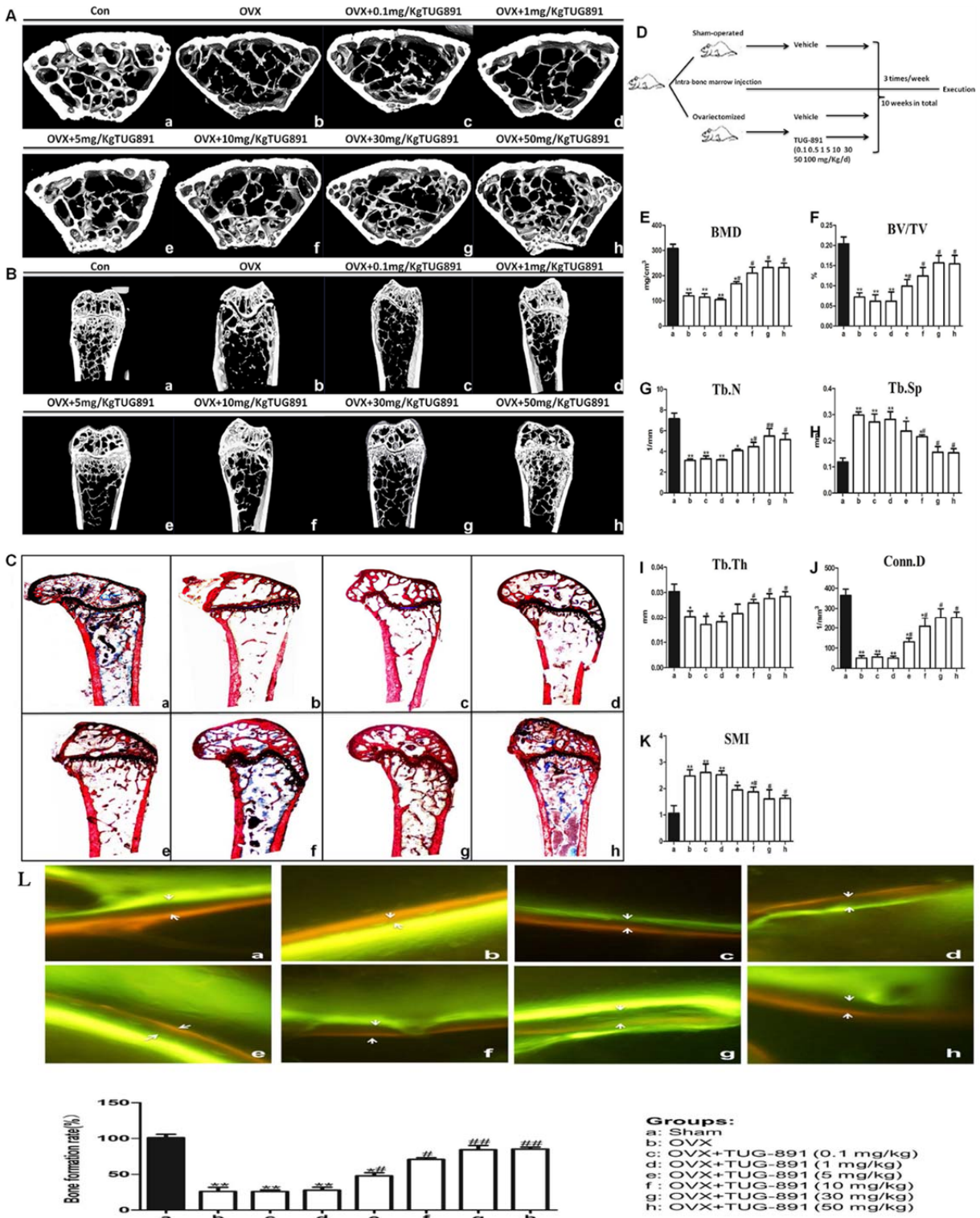


图 2-3-7 骨质疏松条件下 BMSCs 成骨-成脂偶联失衡，而体内激活 GPR120 可显著改善偶联失衡，促进骨稳态

(A-B) 小鼠股骨末端横切面及冠状面的 Micro CT 扫描；(C) 小鼠股骨末端 V&G 染色；(D) 小鼠绝经后骨质疏松造模及髓腔内给予 TUG891 示意图；(E-K) 多种骨质量分析指标如 BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Sp、Tb.Th、Conn.D 与 SMI；(L) 钙黄绿素荧光双标染色及定量。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 代表有统计学差异，NS 代表无统计学差异。

4 讨论

骨髓间充质干细胞的成骨-成脂偶联是此部分关注的重点。本研究中，我们率先发现，骨髓间充质干细胞存在成骨分化向成脂方向直接转分化现象，且此过程受雌激素高度调控，并在骨质疏松等骨退行性变疾病中表现显著。进一步研究表明，脂肪酸受体 GPR120 在骨髓间充质干细胞中高度表达，且通过剂量依赖性效应调控 BMSCs 的成骨-成脂双向分化过程，并通过上调不同的 Integrin 亚基，从而激活不同的下游信号通路，从而起到共调控成骨-成脂偶联的作用。此外，脂肪酸受体 GPR40 同样在 BMSCs 中高表达，且受雌激素调控，参与雌激素成骨效应以及绝经后骨质疏松的骨稳态失衡过程。

脂肪与骨组织作为机体两大代谢系统，广泛参与全身的生物学功能。机体的脂肪根据位置不同分为皮下脂肪、内脏脂肪以及髓内脂肪；根据性质不同分为白色脂肪、米色脂肪以及棕色脂肪。研究表明，皮下脂肪不同于内脏及髓内脂肪，从其中提取的脂肪细胞对 BMSCs 有较强的成骨促进作用，而白色脂肪不仅促进 BMSCs 成脂，且抑制其增殖活性。棕色脂肪主要作为全身产热的“加工厂”，广泛参与机体代谢，其细胞内线粒体功能发达，且分泌多种有效因子，对骨代谢有正向的调控作用。骨髓内脂肪在出生早期，称为“红骨髓”，具有极强的造血能力以及造血维持能力；当机体成熟后或提早经历退行性变，骨髓中的“红骨髓”将逐渐变为“黄骨髓”。在“黄骨髓”的组成成分中，脂肪细胞占全部体积的 80%，其主要来源为骨髓间充质干细胞分化而来，且 BMSCs 向成脂方向分化的过程中从细胞以及分子水平层面往往伴随着成骨分化能力减弱。那么，BMSCs 成骨分化与成脂分化有何区别？两者之间是否存在直接的偶联关系？如果理清其中的潜在分子生物学机制，将从根本上改善骨退行性变过程中的骨稳态失衡以及内环境改变，并维持全身骨量以及骨髓间充质干细胞的代谢活性。

众多研究表明，脂肪组织及细胞仅能负向调控 BMSCs 向成骨方向分化。然而，本课题组通过前期的积累以及对脂代谢的深入研究，我们发现脂代谢的产物脂肪酸，可通过自身受体或其分泌因子正向调控 BMSCs 的成骨分化过程。例如，本研究中率先发现，BMSCs 高度表达 GPR120 (FFAR4)和 GPR40 (FFAR1)，且 GPR120 可通

过剂量依赖性效应，激活不同的 Integrin 家族亚基，从而调控成骨-成脂偶联；GPR40 作为雌激素的关键下游分子，促进 BMSCs 成骨形成效应，从而改善骨退行性变及骨稳态过程。此外，除了机体自身脂代谢产生的内源性脂肪酸外，很多外源性的多聚不饱和脂肪酸可对 BMSCs 的成骨能力起到关键性的调控作用。因此，在髓内微环境中，脂肪组织、脂肪细胞及其分泌因子及代谢产物都将从多方面、多角度影响 BMSCs 的分化命运以及功能状态，而 BMSCs 的改变将进一步改变整个髓内微环境的变化，从而形成多个正向与负向调控循环。

既然脂肪细胞可以调控 BMSCs 成骨过程，那么成骨分化过程中，BMSCs 的成脂分化是否收到影响呢？第一，以 BMSCs 作为中心，当 BMSCs 处于成骨分化过程中，其下游众多成骨转录因子开始表达，与此同时，这些转录因子及下游靶基因将对成脂分化相关因子直接产生负向调控作用，从而使得 BMSCs 成骨分化顺利进行；然而，当骨退行性变以及骨稳态失衡过程中，BMSCs 的自身功能以及成骨分化潜能已然受到影响，且成骨分化因子下调，其对成脂分化关键因子原先的抑制作用减弱，导致成骨分化能力下降、成脂分化取而代之，导致髓内脂肪细胞蓄积，氧化应激反应加重，进一步恶化髓内微环境；第二，以脂肪细胞/组织为中心，BMSCs 分化形成的成骨系细胞，可通过分泌骨钙素，直接调控胰岛 B 细胞的功能，从而引起全身糖脂代谢的改变，导致全身脂肪的重新分配，最终会引起髓内脂肪的变化。所以，BMSCs 的成骨-成脂偶联平衡是骨稳态维持以及骨正常生理代谢的重要支撑因素之一，且成骨-成脂偶联的平衡将决定机体全身内分泌代谢的“和谐统一”。

目前，临床上治疗骨质疏松的药物主要集中于抑制骨吸收药物与促进骨形成药物，然而，改善 BMSCs 的成骨-成脂偶联失衡可能是治疗骨质疏松这种骨内分泌疾病的关键。本研究发现了脂肪酸受体及 GPR120 可显著调控成骨-成脂分化，且体内研究中也证实了激活 GPR120 可显著改善骨质疏松导致的骨量丢失。所以，理清骨髓间充质干细胞的成骨-成脂偶联的具体方式，以及其潜在的作用机制及靶点，将有助于我们为临床治疗骨退行性变及骨稳态失衡提供新思路、新方向。

第三部分 肥大软骨细胞来源干细胞的鉴定及其在骨稳态与骨退行性变中的作用

骨骼不仅赋予了脊椎动物的形态，还可控制躯体运动并且保护重要脏器。在发育过程中，骨骼系统是由间充质干细胞(MSCs)通过两类不同的成骨机制构成：膜内成骨与软骨内成骨[38, 39, 212]。而软骨内成骨是脊椎动物骨骼发育的主要形式，其参与形成了除额骨、顶骨和上、下颌骨以外全身几乎所有的骨骼系统。

软骨内成骨过程开始于 MSCs 聚集并分化为两种类型细胞，即分化成软骨成分的软骨细胞以及包绕软骨组织的软骨膜细胞。随后，初始阶段的软骨细胞通过从增殖性软骨细胞转化为无增殖活性的肥大软骨细胞。长久以来，肥大软骨细胞被认为是不可增殖、不可分化的终末分化软骨细胞，通过动态偶联软骨与骨形成从而在骨骼胚胎期发育中起到支撑作用。然而，肥大软骨细胞的最终转归与命运这一关键科学性问题始终存在争议：有观点认为肥大软骨细胞可继续分化为成骨系细胞[43]，另有观点认为肥大软骨细胞将走向最终的凋亡。由于缺乏体内的遗传学与转基因小鼠的证据，该争议尚未有结论。

近期有相关研究表明，肥大软骨细胞可直接向成骨细胞转分化，并贡献了松质骨中近 30%的成骨系细胞，提示其具有向成骨 lineage 直接转化的能力。有趣的是，研究发现肥大软骨细胞除了向成骨细胞分化以外，重新获得了细胞增殖能力，且贡献了髓内 20%的脂肪细胞以及大量的血管周细胞[45]。这些新发现将肥大软骨细胞转分化的意义推向了一个新高度：提示肥大软骨细胞在转分化为成骨细胞之前，可能需要先经历去分化过程成为多向分化干细胞，并在特定条件下向成骨细胞或脂肪细胞转化。那么，我们传统意义上认为的“终末分化”的肥大软骨细胞，是否在骨骼发育过程中作为一股“新力量”成为肥大软骨细胞来源干细胞，从而参与机体骨骼发育以及软骨内成骨的过程？在生理条件下，肥大软骨细胞来源干细胞在体内的生理功能是什么？另外，在骨退行性疾病如骨质疏松及衰老条件下，肥大软骨细胞来源干细胞是否参与髓内脂肪的形成以及退行性疾病的进程？

本研究在前期的工作基础上,利用 Col10a1-Cre; R26R;TdTomato 小鼠以及 DTA 小鼠,通过免疫共定位以及荧光示踪的方法,对肥大软骨细胞来源干细胞的起源与转归进行了研究,并进一步阐明了其在造血系统中的功能。通过建立绝经后骨质疏松模型以及衰老小鼠模型,对肥大软骨细胞来源干细胞在骨稳态与骨退行性中的作用机制做了进一步探讨。

1 材料

1.1 仪器设备

激光共聚焦显微镜	Olympus, Japan
紫外线光源机	OmniCure, Canada
视体显微镜	Olympus, Japan
BX-60 型荧光显微镜	Olympus, Japan
细胞培养箱	Thermo, Germany
冰冻切片机	Norderstedt, Germany
细胞超净台	苏州净化仪器设备厂
自动组织染色机	Thermo, Germany
L-500 离心机	湘仪实验仪器有限公司
450 酶标仪	Biorad, USA

1.2 实验动物与试剂

Col10a1-Cre 小鼠	Jackson laboratory, USA
LepR-Cre 小鼠	Jackson laboratory, USA
R26R-Tdtomato 小鼠	Jackson laboratory, USA
B6-DTA 小鼠	Jackson laboratory, USA
Scf-GFP 小鼠	Jackson laboratory, USA
C57 小鼠	第四军医大学实验动物中心
ALP 试剂盒	碧云天公司
异丙醇	天津红岩化学试剂厂

胎牛血清	Gibco, Canada
苏木精	Sigma, USA
茜素红染液	Sigma, USA
β -甘油磷酸钠	Sigma, USA
DAPI	Sigma, USA
青霉素和链霉素	Sigma, USA
多聚甲醛	碧云天公司
胰酶粉剂	碧云天公司
甲苯胺蓝	碧云天公司
明胶 Gelatin	碧云天公司
戊二醛	天津红岩化学试剂厂
无水酒精	天津红岩化学试剂厂

2 方法

2.1 肥大软骨细胞来源干细胞的提取

将不同分组 Col10a1-cre;R26R;Tdtomato 小鼠分别置于超净台上, 将脱颈处死小鼠置于 70%酒精中 4-8 min。仔细分离小鼠股骨和胫骨, 充分去除骨面上附着的肌肉、脂肪和韧带等。剪去两端干骺端。用注射器吸取无血清培养液充分冲洗骨髓腔, 重复 2-3 次。使用滴管将收集的冲洗液直接接种于 15ml 离心管中, 进行随后的流式细胞学筛选及鉴定。

2.2 肥大软骨细胞来源干细胞的鉴定

2.2.1 流式细胞学检测

- 1) 在前期研究中对肥大软骨细胞进行示踪, 发现其在胚胎骨形成时期大量向髓腔内迁移并逐渐聚集于此。所以, 我们将提取骨髓腔内的细胞, 滴入红细胞裂解液, 作用 10min, 并在 4℃低温下利用高速离心机以 1200r 离心 5min;
- 2) 用流式专用缓冲液重悬细胞, 并在 4℃低温下将细胞洗涤三次, 每次 5min; 首先给予细胞加入 APC Mouse Anti-Mouse CD45.1 (Bio-Legend, 561873), APC Rat

Anti-Mouse CD31 (Bio-Legend, 561814), APC Rat Anti-Mouse TER119 (Bio-Legend, 561033), 并根据分组不同区分为 Col10a1-TdTomato⁺SCF-GFP⁺与 Col10a1-TdTomato⁺SCF-GFP⁻细胞群, 并用 LepR-cre;Tdtomato⁺细胞作为对照, 在 4℃ 下孵育 30min, 并用洗涤液洗涤三次, 每次 5min;

- 3) 通过 5-laser BD FACS 和 FACSDiva 将细胞上机, 分别筛选出 Col10a1-TdTomato⁺SCF⁻GFP⁺CD45⁻Ter119⁻CD31⁻ 细胞和 Col10a1-TdTomato⁺SCF⁻GFP⁻CD45⁻Ter119⁻CD31⁻细胞, 验证其自我更新以及多向分化潜能, 并验证其与其他干细胞表面标志物之间的相关性; 通过 FACSCalibur flow cytometer、CellQuest software 和 Flowjo 分析流式细胞学检测结果。

2.2.2 肥大软骨来源干细胞三系分化功能测定

- 1) 成骨分化: 取 2.2.1 筛选细胞, 接种于细胞培养六孔板中进行常规细胞培养 (10⁵ 个细胞/每孔), 待细胞增殖直至铺满孔板底面 70%左右后, 使用成骨分化培养基 (100nM 地塞米松、50 μM L-抗坏血酸、100mM β 甘油磷酸钠溶于 10%高糖 DMEM 培养基中), 进行 21 天成骨分化诱导;
- 2) 成脂分化: 取 2.2.1 筛选细胞, 接种于六孔板中进行常规细胞培养 (1 × 10⁵ 个/孔), 待细胞铺满至孔板底面 70%左右后, 使用成脂分化诱导液 (10 mM 地塞米松, 5mg/ml 胰岛素, and 0.5 mM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤溶于 10%高糖 DMEM 培养基中), 进行 14 天成脂分化诱导; 并通过油红 O 染色确定脂肪分化及脂滴形成情况。
- 3) 成软骨分化: 取 2.2.1 筛选细胞, 并以 10⁵ 个细胞密度接种于聚丙烯小管中, 使用成软骨诱导培养 (0.1 mM 地塞米松, 1% insulin-transferrin-sodium selenite mix, 50 mM 抗坏血酸, 1mM 丙酮酸钠, 50 μg ml⁻¹ 脯氨酸 and 20 ng ml⁻¹ TGF-β3 溶于 10%高糖 DMEM 培养基中), 进行 21 天成软骨分化诱导。

2.3 小鼠卵巢切除术

- 1) 用提前至备好的麻醉药品经腹腔注射入两月龄 Col10a1-cre;R26R;Tdtomato 小鼠体内, 进行常规麻醉。麻醉药品 (1%戊巴比妥钠, 剂量为 50mg/kg)。
- 2) 将小鼠置于手术操作台上, 使小鼠置于俯卧位, 固定后充分暴露术野, 用小鼠去毛器于肋缘下 1cm, 脊椎旁 2cm 处剔除毛发, 并使用碘伏进行术野消毒。通

过镊子钝性分离腰背部肌肉，通过显微镜顺着输卵管观察两侧卵巢和对称相联的子宫角。

- 3) 用无齿镊小心提拉脂肪组织，剪断子宫角后在显微镜下将卵巢摘除，观察出血情况后将背部肌肉层与腹膜层逐一缝合，确定无空隙后通过单纯间断缝合方式闭合皮肤。将取下的卵巢称重，并拍照。
- 4) 术后 48h 给予青链霉素抗感染，并在 8 周后扫描 Micro-CT,确定造模成功。

2.4 免疫荧光染色

将所取不同分组小鼠股骨给予 4%多聚甲醛固定 4 小时、10% EDTA 脱钙 3 天、阿拉伯胶脱水 1 天后将组织用 OCT 包埋，通过冰冻切片机在-20℃切取 10 μm 厚度进行免疫荧光检测。用提前恢复到室温的 PBS 洗 1 遍，并通过 10 分钟进行水化；水化完成后用免疫组化笔画圈，防止染色液体渗漏，并用 PBS 将各组样本洗三遍，5 min×3 次，彻底清除免疫组化笔所留残渣。小心轻柔弃去 PBS 后，在各组样本上轻柔的滴加 Triton X-100 进行打孔，并置于 37℃培养箱中 15 min，然后再用 PBS 洗三遍，5 min×3 次。用二抗特异性来源种属封闭液封闭样本 1 小时，然后用抗体稀释液根据不同的抗体进行稀释，并孵育 4℃过夜。次日取出后置于 37℃敷箱中复温 1 h，并用 PBS 洗三遍，5 min×3 次。用抗体稀释液 根据不同种属不同类别，稀释二抗。每个样本中加入 250 μl 稀释后二抗，37℃敷箱避光孵育标本 1 h，然后用 PBS 洗三遍，5min×3 次。轻轻吸去玻片上液体后，滴入 100 μl 含 DAPI 的封片液。吸取适量 50%甘油滴于载玻片上。用镊子夹持盖玻片从一侧缓慢压住液滴放下，盖在载玻片中间位置上，且不留气泡，用滤纸吸去多余封片液，4℃避光保存。在 Zeiss LSM780 激光共聚焦显微镜下通过特定选区内选取每个标本随机视野，并在镜下区域计数阳性细胞并统计。

2.5 肥大软骨细胞来源干细胞三系分化检测具体方法同第二部分实验三。

2.6 显微 CT 取材具体方法同第二部分实验二。

2.7 显微 CT 扫描分析具体方法同第二部分实验二。

2.7 统计分析

所得数据利用 SPSS19.0 软件进行统计学单因素方差分析(one-way ANOVA)进行组间比较,以 Bonferroni 进行两两互相比,统计数据呈现为均数 \pm 标准差($\bar{X} \pm \text{SD}$), $p < 0.05$ 为具有显著统计学差异。

3 结果

3.1 肥大软骨细胞来源细胞在髓腔内大量存在, 并主要聚集于干骺端与骨内膜。

为了在体内对肥大软骨细胞的转归进行荧光示踪, 我们首先将肥大软骨细胞特异性小鼠 Col10a1-Cre 与 R26R;TdTomato 小鼠配种, 这样得到的子代中瞬时表达 Col10 的细胞与 Col10 来源的细胞都可被红色荧光标记。在荧光显微镜下观察可见, 在出生后 10 天 (p10) Col10a1-Cre; R26R;TdTomato 小鼠中, 我们发现原本在胚胎期位于肥大区的软骨细胞在干骺端、松质骨区、骨内膜、皮质骨区以及骨髓腔中存在, 并且在干骺端、第一松质骨区(First Spongiosa)大量表达,提示其主要参与出生后松质骨的形成(图 3-1, A)。有研究表明, 原本呈软骨样的 Col10⁺来源细胞渐渐变为长梭形, 并随着年龄的增长其在骨髓腔中位置的分布与形态会有部分区别, 提示肥大软骨细胞可向下迁移, 并参与骨的形成与发育。随后, 我们通过流式细胞学技术, 筛选出 Col10a1-Cre;TdTomato⁺小鼠的 Col10a1-TdTomato⁺ CD45⁻Ter119⁻CD31⁻细胞进行三系分化诱导以及体外 CFU-F 检测。结果显示, Col10a1-TdTomato⁺ CD45⁻Ter119⁻CD31⁻细胞与 CD45⁻Ter119⁻CD31⁻对照组细胞相比, 具有较强的三系分化能力以及增殖潜能(图 3-1,B-E)。

3.2 肥大软骨细胞来源干细胞具有双向分化能力

通过明确 Hypertrophic Chondrocyte-derived Cell 在骨形成期的分布位置与形态后, 我们对 Col10a1-Cre; R26R;TdTomato 小鼠股骨进行免疫荧光染色(成骨 Osx、脂肪 Perillipin), 我们发现肥大软骨细胞来源的细胞在骨形成期可与 Osx⁺细胞大量 overlap, 提示其在体内向成骨细胞分化; 并且, 肥大软骨细胞来源的细胞可与 Perillipin⁺细胞 overlap, 提示其也在体内可向脂肪细胞分化(图 3-2)。上述结果表明肥大软骨细胞来源细胞具有双向分化能力, 且大部分在骨形成期向成骨细胞分化, 证实了 Col10⁺-derived 细胞(HC-MSC)具有潜在“干性”, 并且对骨发育及骨形成具

有重要调控作用。

3.3 肥大软骨细胞来源细胞主要位于血管周围并具有增殖活性

研究表明,干细胞除具有多向分化能力外,还具有自我更新潜能。在骨髓腔中,干细胞主要位于其“干细胞龛”内;目前已知的干细胞龛主要有血管周以及骨内膜表面。所以,为了进一步探明肥大软骨细胞来源干细胞的“干性”,我们在 Col10a1-Cre; R26R; TdTomato 小鼠处死前 2 小时给予 Edu 注射,并通过免疫荧光观察其增殖情况。结果显示,骨髓腔中的 HC-MSc 与 Edu 高度 overlap,提示其强大的增殖潜能。我们进一步通过免疫荧光染色(血管内皮 marker-Endomucin)证实,HC-MSc 主要在血管周围聚集,提示在骨髓腔中位于 perivascular niche 内,进行自我更新,并在骨形成时期大量向成骨细胞分化(图 3-3)。

3.4 肥大软骨细胞来源干细胞在骨生长期与 LepR⁺细胞高度重合

大量研究已证实,LepR⁺细胞作为成年期小鼠骨髓间充质干细胞一个主要的集落,广泛参与成骨并作为髓腔内脂肪细胞的主要来源。由于 HC-MSc 无论从位置分布以及功能上都与 LepR⁺细胞相似,我们推测 HC-MSc 是否可作为 LepR⁺细胞的一个分支,在骨形成早期发挥作用。通过免疫荧光染色 LepR,我们发现 Col10⁺细胞与 LepR⁺细胞高度 overlap,并主要在松质骨表面以及 perivascular niche 内重合。上述结果表明,HC-MSc 在胚胎期及出生早期参与骨发育;当成熟期时,HC-MSc 可能作为 LepR⁺MSCs 的一个潜在分支,作为“干细胞 pool”为成熟期骨量的维持提供支持作用。

3.5 肥大软骨细胞来源干细胞对小鼠骨骼生长发育起到关键性调控作用

为了验证 HC-MSc 在体内对骨形成的重要调控作用,我们将 Col10a1-cre 小鼠与 DTA 小鼠在一起配种得到 Col10a1-cre; DTA 小鼠,其子代所有 Col10⁺细胞以及 Col10⁺来源细胞都将发生凋亡并丧失功能。有趣的是,Col10a1-cre; DTA 小鼠在 P21 天死亡。我们发现,与对照组相比,Col10a1-cre;DTA 小鼠的躯干、四肢都显著缩短,且颅骨发育异常(图 3-5, A,B)。Col10a1-cre; DTA 小鼠的 H&E 染色结果显示,其股骨肥大区软骨细胞 expand 发生异常,次级骨化中心形成障碍,软骨内成骨过程明显延迟(图 3-5, C)。上述结果提示,肥大软骨细胞来源细胞对小鼠骨骼生长发育起到关键性调控作用。

3.6 肥大软骨细胞来源干细胞在骨退行性变过程中增殖减弱并大量向脂肪细胞分化

为了证实 HC-MSCs 在骨退行性变中的作用,我们在 Col10a1-Cre; R26R; TdTomato 小鼠中建立了卵巢缺失导致的骨质疏松模型。通过免疫荧光染色显示 (Edu, 细胞增殖; perillipin, 脂肪细胞; LepR, LepR⁺细胞), HC-MSCs 在骨质疏松情况下增殖活性大量减弱、且数量减少;有趣的是, HC-MSCs 在骨退行性变进程中成脂分化能力显著增强,并与 LepR⁺细胞大量 overlap (图 3-6)。上述结果表明, HC-MSCs 在生理情况下对骨形态的维持与骨生长发育起到重要的调控作用;然而,在骨退行性变情况下, HC-MSCs 可作为髓腔内脂肪细胞的来源,参与骨退行性变的疾病进展。

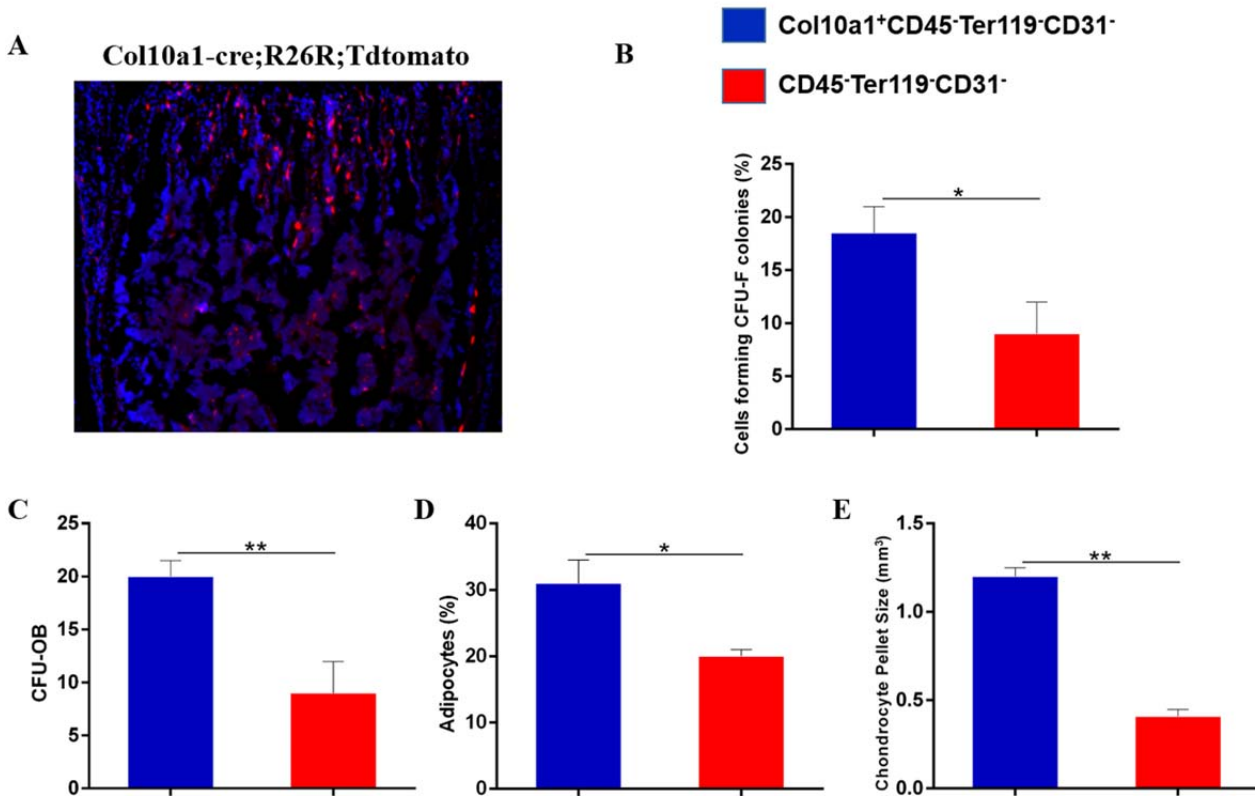


图 3-1 Col10a1-cre;R26R;Tdtomato 小鼠 Col10⁺细胞在髓腔内分布及其自我更新和三系分化潜能。

(A) Col10a1-cre;R26R;Tdtomato 小鼠荧光染色, 红色, TdTomato;蓝色, DAPI。 (B-E) Col10a1-TdTomato⁺ CD45⁻ Ter119⁻ CD31⁻细胞与 CD45⁻ Ter119⁻ CD31⁻的 CFU-F 形成能力 (B)、成骨分化能力 (C)、成脂分化能力 (D) 以及成软骨 (E) 分化能力。* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、*** $p<0.001$ 代表有统计学差异, NS 代表无统计学差异。

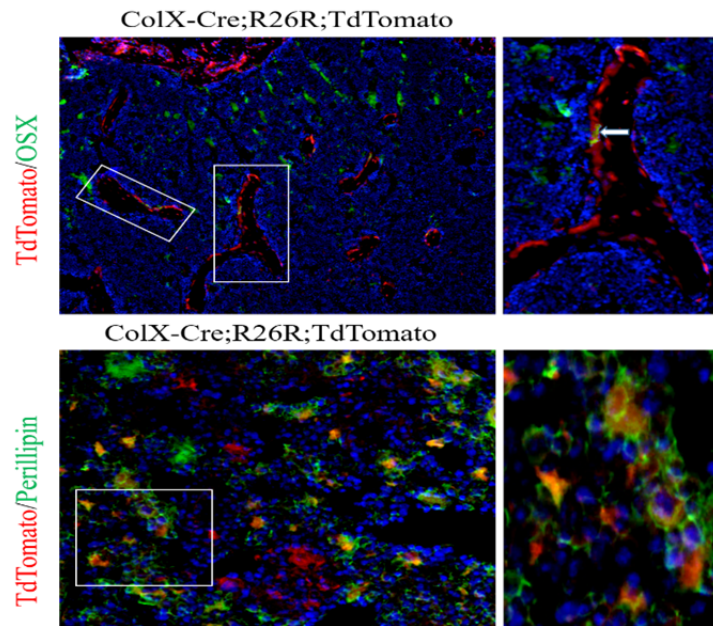


图 3-2 Col10a1-cre;R26R;Tdtomato 小鼠股骨中 Col10⁺细胞可向成骨及成脂双向分化
红色, TdTomato; 绿色, OSX(成骨细胞 Marker), Perillipin(脂肪细胞 Marker), 蓝色, DAPI。
箭头所示为 Col10⁺细胞来源的成骨前体细胞。

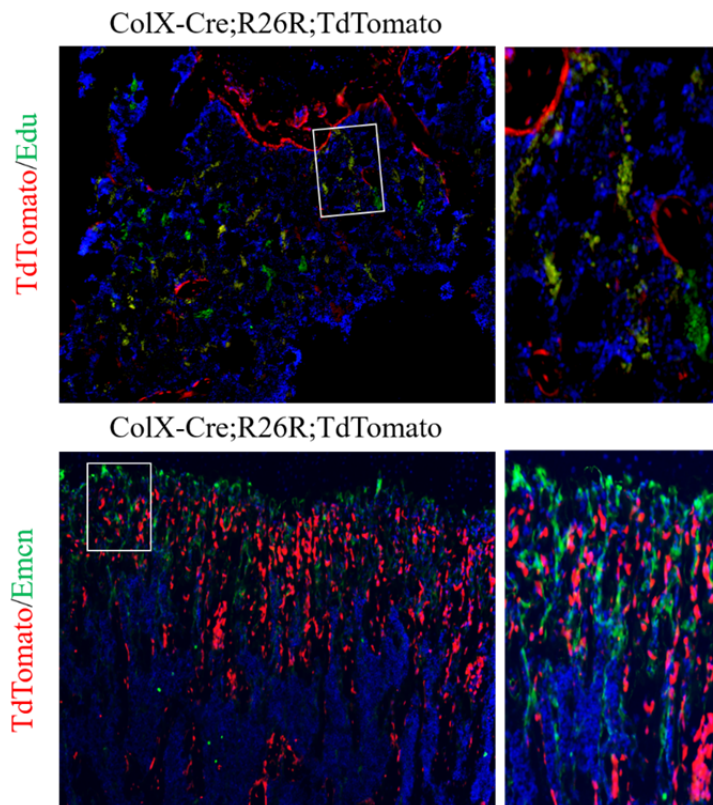


图 3-3 Col10a1-cre; R26R; Tdtomato 小鼠股骨中 Col10⁺细胞具有增殖活性, 并位于
血管内皮细胞周围。红色, TdTomato; 绿色, Edu(细胞增殖 Marker), Emcn (Endomucin,
血管内皮细胞 Marker), 蓝色, DAPI。

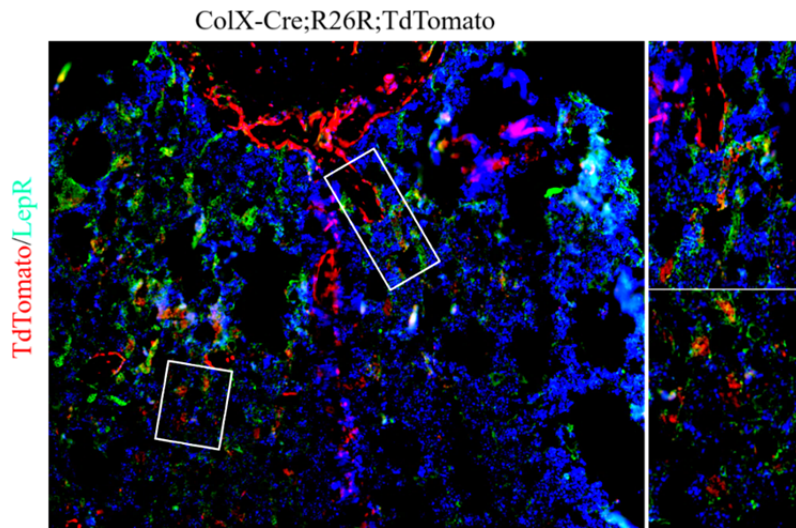


图 3-4 Col10a1-cre;R26R;Tdtomato 小鼠股骨中 Col10⁺细胞与 LepR⁺细胞在松质骨表面与髓腔中高度重合。红色，TdTomato; 绿色，LepR; 蓝色，DAPI。

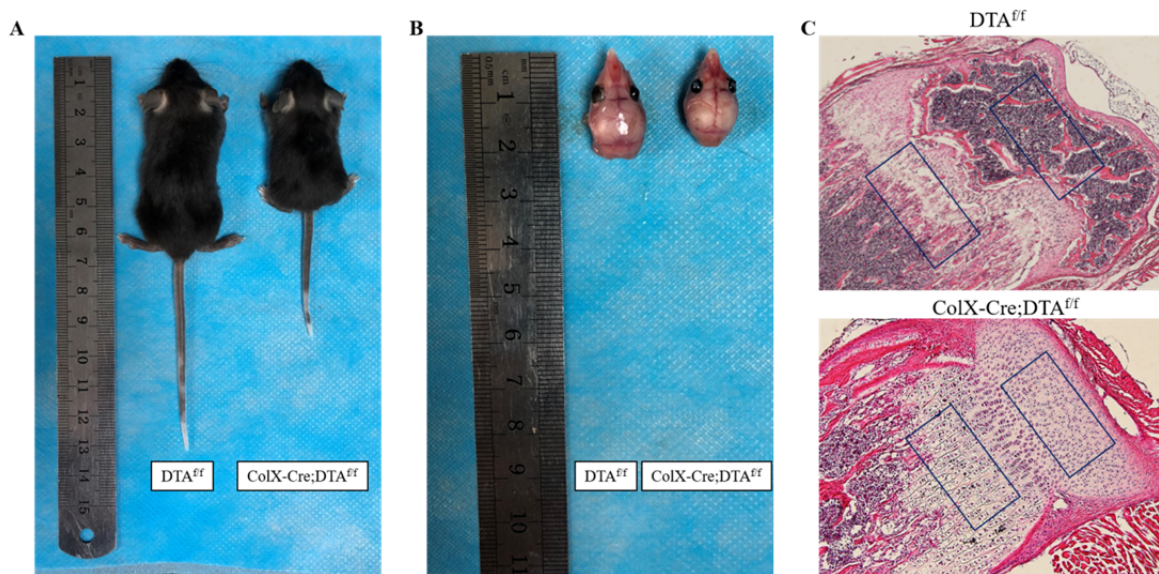


图 3-5 Col10a1-cre;DTA^{f/f} 小鼠骨骼发育异常。(A-B) Col10a1-cre;DTA^{f/f} 小鼠与对照小鼠 DTA^{f/f} 整体观与颅骨大体外观; (C) Col10a1-cre; DTA^{f/f} 小鼠与对照小鼠 DTA^{f/f} 整体 HE 染色。蓝色方框所示为次级骨化中心与干骺端。

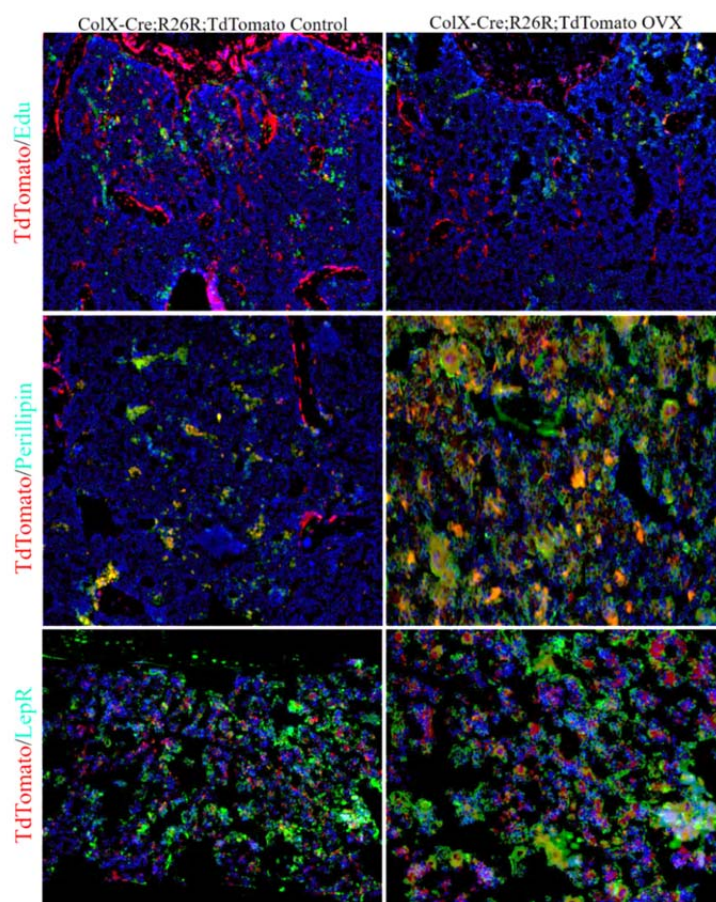


图 3-6 Col10a1-cre;R26R;Tdtomato 小鼠在绝经后骨质疏松情况下 Col10⁺细胞增殖能力下降、成脂分化能力增强，且与 LepR⁺细胞大量重合。红色，TdTomato；绿色，Edu (细胞增殖 Marker), Perillipin (脂肪细胞 Marker), LepR；蓝色，DAPI。

4 讨论

骨骼干细胞的起源、分布、功能以及转归一直是骨代谢与再生领域研究的重点与难点。其中，肥大软骨细胞来源干细胞（HC-MSc）的发现意义重大。传统观点认为，肥大软骨细胞作为终末分化细胞，主要参与骨骼的延长以及软骨的发育。课题组前期工作率先表明，肥大软骨细胞可通过转分化“transdifferentiation”作用分化为成骨前体细胞，在骨生长发育期提供相应的支持。随着研究的进展，军事医学科学院团队发现肥大软骨在转分化过程中，部分可经历去分化过程形成具有多向分化能力及自我更新潜能的间充质细胞，并可向多个 lineage 分化。然而，在体内并没有直接证据证实肥大软骨细胞来源干细胞的多向分化能力以及其在生理条件下及骨退行性变进程中的作用。我们在本研究中通过使用 Col10a1-Cre; R26R;Tdtomato 小

鼠以及 Col10a1-Cre; DTA 小鼠，从多角度对 HC-MSCs 进行了示踪，并证实了 HC-MSCs 的潜在干性以及其在骨退行性变如骨质疏松进程中的功能及转归，为后期通过针对 HC-MSCs 作为靶点治疗骨退行性变提供新思路。

机体主要通过两种方式参与骨形成过程：膜内成骨与软骨内成骨。软骨内成骨一般是指在干细胞预先形成的软骨雏形中，软骨细胞逐渐凋亡，并由募集而来的 MSCs 成骨分化并逐渐形成骨的过程。软骨内成骨为最常见的一种骨发生形式，大部分长骨、短骨以及小部分不规则骨均通过此种方式形成。所以，目前教科书中阐述的肥大软骨细胞为终末分化的细胞。由于软骨内成骨的发生过程在体内非常广泛，发现并阐明肥大软骨来源干细胞的意义至关重要。从转分化意义来讲，为何机体需要肥大软骨细胞去分化为干细胞？我们知道，在机体发育早期，骨形成之前，整个骨骼系统主要由软骨雏形构成，其中大部分组成成分为各个发育时期的软骨细胞，当初级骨化中心开始形成时，传统观点认为软骨细胞逐步发生凋亡，并随着血管的长入带来了骨外膜来源的干细胞。然而，从机体能量守恒以及能量最简原则分析，如果原位的软骨细胞可以直接转化为干细胞，那么机体需要干细胞所花费的能量将大大减少。并且，在胚胎形成时期由于软骨细胞数量众多=多，那么软骨细胞来源的干细胞数量也会非常充裕。所以，在机体初级骨化中心形成时，原位的软骨细胞以及肥大区的软骨细胞可通过特定的调控方式，去分化为具有多向分化潜能的干细胞，并参与初级骨化中心的形成；而由血运中带来的骨外膜来源干细胞，也将作为初级骨化中心形成的组成部分，参与早期骨发育过程。

我们在免疫荧光染色结果中发现，HC-MSCs 大量贴附于血管内皮周围，提示其对髓内血管可能起到潜在调控作用。研究表明，髓腔中存在一群 perivascular 细胞，对干细胞 niche 的维持以及骨稳态及骨微环境的调控起到关键性作用。其中，Nestin⁺细胞、Scal⁺细胞、CD146⁺细胞、Pdgfrb⁺细胞以及 LepR⁺细胞都已证实位于 periarticular 或 perisinoidal 旁，通过分泌多种因子，调控血管的生长以及造血干细胞的维持，在后期的研究中，我们将重点观察 HC-MSCs 在上述过程中的具体功能。

在本研究中，我们发现肥大软骨细胞特异性清除小鼠 Col10a1-Cre;DTA 小鼠在出生后 21 天死亡，然而，骨形成障碍或者肥大区软骨细胞 expand 受阻都不会影响其生存，那么此发现进一步提示了 HC-MSCs 在出生早期可能参与更加关键的代谢

过程。有研究表明, $LepR^{+}MSCs$ 不仅作为成年期小鼠骨形成以及髓内脂肪形成的重要来源, 也可通过分泌 SCF, 调控小鼠髓腔内的造血干细胞的维持与迁移。我们在前期研究中已发现, HC-MSCs 与 $LepR^{+}MSCs$ 在出生后早期高度 overlap, 并且大量集聚于血管周围, 提示其可能与 $LepR^{+}MSCs$ 功能相似, 参与机体早期造血系统的维持。在后续的研究中, 我们将进一步阐明 HC-MSCs 在出生早期骨生长以及造血系统维持方面的关键作用, 并通过筛选特异性的小分子药物, 调控 HC-MSCs 的活性, 以其作为靶点调控早期峰值骨量的形成及造血系统的维持。

目前, 种子细胞库以及干细胞移植已成为了治疗相关疾病的热点, 通过阐明肥大软骨细胞来源于干细胞这一分支在生理条件下以及骨退行性变进展过程中的具体功能以及命运转归, 不仅为日后的研究提供了重要的理论依据及研究基础, 且有助于基于骨骼干细胞治疗骨退行性疾病的研究进展。

小 结

本课题以多种来源骨骼干细胞作为研究目标，围绕骨外膜来源干细胞、骨髓间充质来源干细胞以及肥大软骨来源干细胞在骨稳态以及骨退行性变中的作用与功能进行了三部分研究。第一部分中，我们通过流式细胞学技术以及大量模式动物，率先鉴定出了骨外膜来源干细胞并阐明了其在皮质骨形成及稳态中的作用；其次，通过建立多种骨退行性变模型、药物治疗以及体外慢病毒干预，我们理清了骨髓间充质干细胞的增殖、分化、凋亡、自噬与衰老在骨稳态维持及骨退行性变进程中的具体作用，并阐明了多种潜在治疗药物；另外，通过示踪肥大软骨细胞特异性小鼠，我们率先鉴定出了肥大软骨细胞来源干细胞，并阐明了其在出生后早期对骨生长以及骨与造血系统稳态的关键性作用。

本课题的主要结论与研究成果如下：

1. 通过流式细胞学技术、体内荧光示踪、连续干细胞移植实验、体内、外三系分化及单克隆实验，我们率先鉴定出两群具有“干性”的骨外膜干细胞。其中， $Nestin^+PDGFR\alpha^+CD31^-Ter119^-CD45^-$ 细胞在发育期、 $LepR^+CD31^-Ter119^-CD45^-$ 细胞在成熟期参与皮质骨的形成与骨量的维持，并且受骨外膜 $Trap^+$ 细胞的募集，大量从骨外膜的外层逐步迁移至骨表面发挥作用。另外， $Nestin^+PDGFR\alpha^+CD31^-Ter119^-CD45^-$ 细胞不仅可参与骨形成，其对骨外膜血管的生长以及骨外膜 niche 的维持也起到关键性作用。在皮质骨损伤模型中，我们发现上述两群干细胞可大量募集到皮质骨损伤区域，参与重新构建成骨-成血管偶联，恢复局部血运并促进骨损伤的愈合与修复。

2. 通过建立绝经后骨质疏松模型、激素诱导骨质疏松模型以及自然骨衰老模型，我们详细并分别阐明了多种骨退行性变模型中骨髓间充质干细胞的增殖下降、成骨-成脂分化偶联失衡、保护性自噬反应下降、凋亡增多以及不可逆性衰老的具体作用机制。具体来说，我们发现髓腔内通过四甲基吡嗪局部清除衰老 MSCs 可显著延缓骨衰老进程；高浓度地塞米松可诱导 MSCs 大量凋亡，而 EPA 可通过上调 GPR120 从而激活受损的保护性自噬反应，从而显著抑制 MSCs 的凋亡，改善激素诱导骨质

疏松导致的骨稳态失衡;绝经后骨质疏松导致 MSCs 成骨-成脂偶联失衡,而 GPR120 是调控此偶联的关键信号通路,我们通过特异性激动剂 TUG-891,发现 GPR120 可激活不同的 Integrin 家族,从而调控成骨-成脂偶联,改善绝经后骨质疏松导致的骨稳态失衡;此外,雌激素可抑制骨质疏松情况下的成骨-成脂转分化过程,从而延缓骨退行性变的进展。

3. 通过体内荧光示踪肥大软骨细胞的命运及转归,我们率先发现了肥大软骨细胞来源干细胞(HC-MSCs)在骨发育及骨稳态中的关键作用。此外,通过建立绝经后骨质疏松模型,我们发现 HC-MSCs 在生理条件下作为骨骼干细胞的重要成分,参与骨发育及骨生长;而在骨退行性变过程中,HC-MSCs 增殖能力减弱,并大量向脂肪细胞分化,从而加重骨退行性变的进展。

围绕多种来源的骨骼干细胞,并通过以上三个部分的研究,本人以第一及共同第一作者先后在 Aging Cell、Cell Death&Disease、Stem Cell&Development 等本领域权威杂志发表 SCI 论文 17 篇,最高影响因子 6.714 分(Aging Cell, 一区),累计影响因子约 60 分,其中包括原创性论著 16 篇,综述 1 篇,两年被引用率 226 次。我们通过不同角度研究了多种来源骨骼干细胞对骨稳态的关键作用,丰富了相关学说和治疗方案。本研究系统性的阐明骨骼干细胞在骨稳态与骨退行性变中的相关学说,并为未来的干细胞治疗与应用提供了关键性的研究基础与理论依据。

参考文献

- [1] Tang Y, Feinberg T, Keller ET, Li XY, Weiss SJ. Snail/Slug binding interactions with YAP/TAZ control skeletal stem cell self-renewal and differentiation. *NAT CELL BIOL*. 2016;18: 917-29.
- [2] Tevlin R, Young SE, Marecic O, Wearda T, Mc AA, Januszyk M, et al. Skeletal Stem Cell Niche Aberrancies Underlie Impaired Fracture Healing in a Mouse Model of Type 2 Diabetes. *PLAST RECONSTR SURG*. 2015;136: 73.
- [3] Osorio J. Stem cells: Back to the origins--identifying the skeletal stem cell. *NAT REV ENDOCRINOL*. 2015;11: 132.
- [4] Chan CK, Seo EY, Chen JY, Lo D, McArdle A, Sinha R, et al. Identification and specification of the mouse skeletal stem cell. *CELL*. 2015;160: 285-98.
- [5] Ferretti C, Lucarini G, Andreoni C, Salvolini E, Bianchi N, Vozzi G, et al. Human Periosteal Derived Stem Cell Potential: The Impact of age. *Stem Cell Rev*. 2015;11: 487-500.
- [6] Hong JH, Hwang ES, McManus MT, Amsterdam A, Tian Y, Kalmukova R, et al. TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *SCIENCE*. 2005;309: 1074-8.
- [7] Embree MC, Chen M, Pylawka S, Kong D, Iwaoka GM, Kalajzic I, et al. Exploiting endogenous fibrocartilage stem cells to regenerate cartilage and repair joint injury. *NAT COMMUN*. 2016;7: 13073.
- [8] James AW, Zhang X, Crisan M, Hardy WR, Liang P, Meyers CA, et al. Isolation and characterization of canine perivascular stem/stromal cells for bone tissue engineering. *PLOS ONE*. 2017;12: e177308.
- [9] Ahmed TA, El-Badri N. Pericytes: The Role of Multipotent Stem Cells in Vascular Maintenance and Regenerative Medicine. *ADV EXP MED BIOL*. 2017.
- [10] Nagasawa T, Omatsu Y, Sugiyama T. Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *TRENDS IMMUNOL*. 2011;32: 315-20.
- [11] Zhou BO, Yue R, Murphy MM, Peyer JG, Morrison SJ. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *CELL STEM CELL*. 2014;15: 154-68.
- [12] Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *NATURE*.

- 2010;466: 829-34.
- [13] Wu X, Pang L, Lei W, Lu W, Li J, Li Z, et al. Inhibition of Sca-1-positive skeletal stem cell recruitment by alendronate blunts the anabolic effects of parathyroid hormone on bone remodeling. *CELL STEM CELL*. 2010;7: 571-80.
- [14] Harkness L, Zaher W, Ditzel N, Isa A, Kassem M. CD146/MCAM defines functionality of human bone marrow stromal stem cell populations. *STEM CELL RES THER*. 2016;7: 4.
- [15] Worthley DL, Churchill M, Compton JT, Taylor Y, Rao M, Si Y, et al. Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential. *CELL*. 2015;160: 269-84.
- [16] Shi Y, He G, Lee WC, McKenzie JA, Silva MJ, Long F. Gli1 identifies osteogenic progenitors for bone formation and fracture repair. *NAT COMMUN*. 2017;8: 2043.
- [17] Tan HB, Giannoudis PV, Boxall SA, McGonagle D, Jones E. The systemic influence of platelet-derived growth factors on bone marrow mesenchymal stem cells in fracture patients. *BMC MED*. 2015;13: 6.
- [18] Murphy MP, Irizarry D, Lopez M, Moore AL, Ransom RC, Longaker MT, et al. The Role of Skeletal Stem Cells in the Reconstruction of Bone Defects. *J CRANIOFAC SURG*. 2017;28: 1136-41.
- [19] Bianco P, Robey PG. Skeletal stem cells. *DEVELOPMENT*. 2015;142: 1023-7.
- [20] Fajardo-Orduna GR, Mayani H, Montesinos JJ. Hematopoietic Support Capacity of Mesenchymal Stem Cells: Biology and Clinical Potential. *ARCH MED RES*. 2015;46: 589-96.
- [21] Duchamp DLO, Julien A, Abou-Khalil R, Frangi G, Carvalho C, Cagnard N, et al. Periosteum contains skeletal stem cells with high bone regenerative potential controlled by Periostin. *NAT COMMUN*. 2018;9: 773.
- [22] Harhaus L, Huang JJ, Kao SW, Wu YL, Mackert GA, Honer B, et al. The vascularized periosteum flap as novel tissue engineering model for repair of cartilage defects. *J CELL MOL MED*. 2015;19: 1273-83.
- [23] Mauprivez C, Bataille C, Baroukh B, Llorens A, Lesieur J, Marie PJ, et al. Periosteum Metabolism and Nerve Fiber Positioning Depend on Interactions between Osteoblasts and Peripheral Innervation in Rat Mandible. *PLOS ONE*. 2015;10: e140848.
- [24] Ozaki A, Tsunoda M, Kinoshita S, Saura R. Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. *J ORTHOP SCI*. 2000;5: 64-70.
- [25] Roberts SJ, van Gastel N, Carmeliet G, Luyten FP. Uncovering the periosteum for skeletal

- regeneration: the stem cell that lies beneath. *BONE*. 2015;70: 10-8.
- [26] Roberts SJ, van Gastel N, Carmeliet G, Luyten FP. Uncovering the periosteum for skeletal regeneration: the stem cell that lies beneath. *BONE*. 2015;70: 10-8.
- [27] Ferretti C, Lucarini G, Andreoni C, Salvolini E, Bianchi N, Vozzi G, et al. Human Periosteal Derived Stem Cell Potential: The Impact of age. *Stem Cell Rev*. 2015;11: 487-500.
- [28] Zou L, Zou X, Chen L, Li H, Mygind T, Kassem M, et al. Multilineage differentiation of porcine bone marrow stromal cells associated with specific gene expression pattern. *J ORTHOP RES*. 2008;26: 56-64.
- [29] Stockmann P, Park J, von Wilmsky C, Nkenke E, Felszeghy E, Dehner JF, et al. Guided bone regeneration in pig calvarial bone defects using autologous mesenchymal stem/progenitor cells - a comparison of different tissue sources. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012;40: 310-20.
- [30] Ribeiro FV, Suaid FF, Ruiz KG, Salmon CR, Papatotto T, Nociti FJ, et al. Periosteum-derived cells as an alternative to bone marrow cells for bone tissue engineering around dental implants. A histomorphometric study in beagle dogs. *J PERIODONTOL*. 2010;81: 907-16.
- [31] Agata H, Asahina I, Yamazaki Y, Uchida M, Shinohara Y, Honda MJ, et al. Effective bone engineering with periosteum-derived cells. *J DENT RES*. 2007;86: 79-83.
- [32] Raab-Cullen DM, Thiede MA, Petersen DN, Kimmel DB, Recker RR. Mechanical loading stimulates rapid changes in periosteal gene expression. *Calcif Tissue Int*. 1994;55: 473-8.
- [33] Pead MJ, Skerry TM, Lanyon LE. Direct transformation from quiescence to bone formation in the adult periosteum following a single brief period of bone loading. *J BONE MINER RES*. 1988;3: 647-56.
- [34] Knothe TM, Yu NY, Jalilian I, Pereira AF, Knothe UR. Periosteum mechanobiology and mechanistic insights for regenerative medicine. *Bonekey Rep*. 2016;5: 857.
- [35] Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J CELL BIOCHEM*. 1994;56: 283-94.
- [36] Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH, Kadiyala S. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res*. 1998S247-56.
- [37] Chang H, Knothe TM. Concise review: the periosteum: tapping into a reservoir of clinically useful progenitor cells. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1: 480-91.
- [38] Zhang H, Shi X, Wang L, Li X, Zheng C, Gao B, et al. Intramembranous ossification and endochondral ossification are impaired differently between glucocorticoid-induced osteoporosis and estrogen deficiency-induced osteoporosis. *Sci Rep*. 2018;8: 3867.
- [39] Xian CJ, Zhou FH, McCarty RC, Foster BK. Intramembranous ossification mechanism for bone

- bridge formation at the growth plate cartilage injury site. *J ORTHOP RES*. 2004;22: 417-26.
- [40] Arsenault AL, Ottensmeyer FP. Visualization of early intramembranous ossification by electron microscopic and spectroscopic imaging. *J CELL BIOL*. 1984;98: 911-21.
- [41] Gerstenfeld LC, Shapiro FD. Expression of bone-specific genes by hypertrophic chondrocytes: implication of the complex functions of the hypertrophic chondrocyte during endochondral bone development. *J CELL BIOCHEM*. 1996;62: 1-9.
- [42] Farnum CE, Wilsman NJ. Morphologic stages of the terminal hypertrophic chondrocyte of growth plate cartilage. *ANAT REC*. 1987;219: 221-32.
- [43] Yang L, Tsang KY, Tang HC, Chan D, Cheah KS. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111: 12097-102.
- [44] Zheng Q, Zhou G, Morello R, Chen Y, Garcia-Rojas X, Lee B. Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *J CELL BIOL*. 2003;162: 833-42.
- [45] Yang G, Zhu L, Hou N, Lan Y, Wu XM, Zhou B, et al. Osteogenic fate of hypertrophic chondrocytes. *CELL RES*. 2014;24: 1266-9.
- [46] Zhu Y, Wang Y, Zhao B, Niu X, Hu B, Li Q, et al. Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis. *STEM CELL RES THER*. 2017;8: 64.
- [47] Karlsson C, Lindahl A. Articular cartilage stem cell signalling. *ARTHRITIS RES THER*. 2009;11: 121.
- [48] Kubosch EJ, Lang G, Furst D, Kubosch D, Izadpanah K, Rolauffs B, et al. The Potential for Synovium-derived Stem Cells in Cartilage Repair. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018;13: 174-84.
- [49] Campbell DD, Pei M. Surface markers for chondrogenic determination: a highlight of synovium-derived stem cells. *Cells*. 2012;1: 1107-20.
- [50] Pei M, He F. Extracellular matrix deposited by synovium-derived stem cells delays replicative senescent chondrocyte dedifferentiation and enhances redifferentiation. *J CELL PHYSIOL*. 2012;227: 2163-74.
- [51] Han SA, Lee S, Seong SC, Lee MC. Effects of CD14 macrophages and proinflammatory cytokines on chondrogenesis in osteoarthritic synovium-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2014;20: 2680-91.
- [52] De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic

- stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum.* 2001;44: 85-95.
- [53] Castro-Silva II, Zambuzzi WF, de Oliveira CL, Granjeiro JM. Periosteal-derived cells for bone bioengineering: a promising candidate. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23: 1238-42.
- [54] Declercq HA, De Ridder LI, Cornelissen MJ. Isolation and Osteogenic Differentiation of Rat Periosteum-derived Cells. *CYTOTECHNOLOGY.* 2005;49: 39-50.
- [55] Eyckmans J, Luyten FP. Species specificity of ectopic bone formation using periosteum-derived mesenchymal progenitor cells. *TISSUE ENG.* 2006;12: 2203-13.
- [56] Brownlow HC, Reed A, Joyner C, Simpson AH. Anatomical effects of periosteal elevation. *J ORTHOP RES.* 2000;18: 500-2.
- [57] Ball MD, Bonzani IC, Bovis MJ, Williams A, Stevens MM. Human periosteum is a source of cells for orthopaedic tissue engineering: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res.* 2011;469: 3085-93.
- [58] Choi YS, Lim SM, Shin HC, Lee CW, Kim SL, Kim DI. Chondrogenesis of human periosteum-derived progenitor cells in atelocollagen. *BIOTECHNOL LETT.* 2007;29: 323-9.
- [59] Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *CELL TISSUE RES.* 2007;327: 449-62.
- [60] Lim SM, Choi YS, Shin HC, Lee CW, Kim DI. Isolation of human periosteum-derived progenitor cells using immunophenotypes for chondrogenesis. *BIOTECHNOL LETT.* 2005;27: 607-11.
- [61] De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum.* 2001;44: 85-95.
- [62] O'Driscoll SW, Saris DB, Ito Y, Fitzimmons JS. The chondrogenic potential of periosteum decreases with age. *J ORTHOP RES.* 2001;19: 95-103.
- [63] Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *MECH AGEING DEV.* 2008;129: 163-73.
- [64] Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *BONE.* 2003;33: 919-26.
- [65] Wang T, Zhang X, Bikle DD. Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing. *J CELL PHYSIOL.* 2017;232: 913-21.

- [66] Ruvalcaba-Paredes EK, Hidalgo-Bastida LA, Sesman-Bernal AL, Garciadiego-Cazares D, Perez-Dosal MR, Martinez-Lopez V, et al. Osteogenic potential of murine periosteum for critical-size cranial defects. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2016;54: 772-7.
- [67] Zellin G, Linde A. Effects of recombinant human fibroblast growth factor-2 on osteogenic cell populations during orthopic osteogenesis in vivo. *BONE*. 2000;26: 161-8.
- [68] Duchamp DLO, Julien A, Abou-Khalil R, Frangi G, Carvalho C, Cagnard N, et al. Periosteum contains skeletal stem cells with high bone regenerative potential controlled by Periostin. *NAT COMMUN*. 2018;9: 773.
- [69] Zhang F, Rong Z, Wang Z, Zhang Z, Sun D, Dong S, et al. Periostin promotes ectopic osteogenesis of CTLA4-modified bone marrow mesenchymal stem cells. *CELL TISSUE RES*. 2017;370: 143-51.
- [70] Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katsuura M, Ozawa H, et al. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *J BONE MINER RES*. 1999;14: 1239-49.
- [71] Itkin T, Gur-Cohen S, Spencer JA, Schajnovitz A, Ramasamy SK, Kusumbe AP, et al. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *NATURE*. 2016;532: 323-8.
- [72] Ramasamy SK, Kusumbe AP, Schiller M, Zeuschner D, Bixel MG, Milia C, et al. Blood flow controls bone vascular function and osteogenesis. *NAT COMMUN*. 2016;7: 13601.
- [73] Simon TM, Van Sickle DC, Kunishima DH, Jackson DW. Cambium cell stimulation from surgical release of the periosteum. *J ORTHOP RES*. 2003;21: 470-80.
- [74] Thomson RC, Mikos AG, Beahm E, Lemon JC, Satterfield WC, Aufdemorte TB, et al. Guided tissue fabrication from periosteum using preformed biodegradable polymer scaffolds. *BIOMATERIALS*. 1999;20: 2007-18.
- [75] Ballock RT, Heydemann A, Izumi T, Reddi AH. Regulation of the expression of the type-II collagen gene in periosteum-derived cells by three members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J ORTHOP RES*. 1997;15: 463-7.
- [76] TONNA EA, CRONKITE EP. THE EFFECTS OF EXTRAPERIOSTEAL INJECTIONS OF BLOOD COMPONENTS ON PERIOSTEAL CELL PROLIFERATION. *J CELL BIOL*. 1964;23: 79-87.
- [77] Mukherjee N, Saris DB, Schultz FM, Berglund LJ, An KN, O' DS. The enhancement of periosteal chondrogenesis in organ culture by dynamic fluid pressure. *J ORTHOP RES*. 2001;19: 524-30.

- [78] Saris DB, Sanyal A, An KN, Fitzsimmons JS, O'Driscoll SW. Periosteum responds to dynamic fluid pressure by proliferating in vitro. *J ORTHOP RES*. 1999;17: 668-77.
- [79] Jones DB, Nolte H, Scholubbers JG, Turner E, Veltel D. Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. *BIOMATERIALS*. 1991;12: 101-10.
- [80] Cheng O, Tian X, Luo Y, Mai S, Yang Y, Kuang S, et al. Liver X receptors agonist promotes differentiation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells into dopaminergic neuron-like cells. *ONCOTARGET*. 2018;9: 576-90.
- [81] Wu Q, Tang J, Li Y, Li L, Wang Y, Bao J, et al. Hepatic differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells using a novel 3D culture system. *MOL MED REP*. 2017;16: 9473-9.
- [82] Creane M, Mc EM, Duffy A, Dawood CS, O'Brien T. A 3-month Safety Assessment of Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal Cells Administered Once by the Intramuscular Route to Immunodeficient Mice. *TOXICOL PATHOL*. 20181669497788.
- [83] Lin P, Correa D, Kean TJ, Awadallah A, Dennis JE, Caplan AI. Serial transplantation and long-term engraftment of intra-arterially delivered clonally derived mesenchymal stem cells to injured bone marrow. *MOL THER*. 2014;22: 160-8.
- [84] Mohamed FF, Franceschi RT. Skeletal Stem Cells: Origins, Functions and Uncertainties. *Curr Mol Biol Rep*. 2017;3: 236-46.
- [85] Harkness L, Zaher W, Ditzel N, Isa A, Kassem M. CD146/MCAM defines functionality of human bone marrow stromal stem cell populations. *STEM CELL RES THER*. 2016;7: 4.
- [86] Liu Y, Strecker S, Wang L, Kronenberg MS, Wang W, Rowe DW, et al. Osterix-cre labeled progenitor cells contribute to the formation and maintenance of the bone marrow stroma. *PLOS ONE*. 2013;8: e71318.
- [87] Ouyang Z, Chen Z, Ishikawa M, Yue X, Kawanami A, Leahy P, et al. Prx1 and 3.2kb Col1a1 promoters target distinct bone cell populations in transgenic mice. *BONE*. 2013.
- [88] Yue R, Zhou BO, Shimada IS, Zhao Z, Morrison SJ. Leptin Receptor Promotes Adipogenesis and Reduces Osteogenesis by Regulating Mesenchymal Stromal Cells in Adult Bone Marrow. *CELL STEM CELL*. 2016;18: 782-96.
- [89] Hu K, Sun H, Gui B, Sui C. Gremlin-1 suppression increases BMP-2-induced osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *MOL MED REP*. 2017;15: 2186-94.
- [90] Perez-Campo FM, Santurtun A, Garcia-Ibarbia C, Pascual MA, Valero C, Garces C, et al. Osterix and RUNX2 are Transcriptional Regulators of Sclerostin in Human Bone. *Calcif Tissue Int*. 2016;99: 302-9.

- [91] Tu Q, Valverde P, Chen J. Osterix enhances proliferation and osteogenic potential of bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;341: 1257-65.
- [92] Lu X, Beck GJ, Gilbert LC, Camalier CE, Bateman NW, Hood BL, et al. Identification of the homeobox protein Prx1 (MHox, Prrx-1) as a regulator of osterix expression and mediator of tumor necrosis factor alpha action in osteoblast differentiation. *J BONE MINER RES*. 2011;26: 209-19.
- [93] Seo HS, Serra R. Deletion of Tgfb2 in Prx1-cre expressing mesenchyme results in defects in development of the long bones and joints. *DEV BIOL*. 2007;310: 304-16.
- [94] Ten BD, Brouwer A, Korving J, Reijnen MJ, van Raaij EJ, Verbeek F, et al. Prx1 and Prx2 are upstream regulators of sonic hedgehog and control cell proliferation during mandibular arch morphogenesis. *DEVELOPMENT*. 2001;128: 2929-38.
- [95] Nicks KM, Fujita K, Fraser D, McGregor U, Drake MT, McGee-Lawrence ME, et al. Deletion of Estrogen Receptor Beta in Osteoprogenitor Cells Increases Trabecular but Not Cortical Bone Mass in Female Mice. *J BONE MINER RES*. 2016;31: 606-14.
- [96] Li H, Liu P, Xu S, Li Y, Dekker JD, Li B, et al. FOXP1 controls mesenchymal stem cell commitment and senescence during skeletal aging. *J CLIN INVEST*. 2017;127: 1241-53.
- [97] Ehninger A, Trumpp A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J EXP MED*. 2011;208: 421-8.
- [98] Gao B, Lin X, Jing H, Fan J, Ji C, Jie Q, et al. Local delivery of tetramethylpyrazine eliminates the senescent phenotype of bone marrow mesenchymal stromal cells and creates an anti-inflammatory and angiogenic environment in aging mice. *AGING CELL*. 2018.
- [99] Jia H, Wang Y, Wang T, Dong Y, Li WL, Li JP, et al. Synergistic effects of G-CSF and bone marrow stromal cells on nerve regeneration with acellular nerve xenografts. *SYNAPSE*. 2017;71: .
- [100] Tamma R, Ribatti D. Bone Niches, Hematopoietic Stem Cells, and Vessel Formation. *INT J MOL SCI*. 2017;18: .
- [101] Chen D, Tang P, Liu L, Wang F, Xing H, Sun L, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote cell proliferation of multiple myeloma through inhibiting T-cell immune responses via PD-1/PD-L1 pathway. *CELL CYCLE*. 2018;1-33.
- [102] Jin X, Zhang Z, Lu Y, Fan Z. Suppression of long non-coding RNA LET potentiates bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) proliferation by up-regulating TGF-beta1. *J CELL BIOCHEM*. 2018;119: 2843-50.
- [103] Morikawa S, Ouchi T, Shibata S, Fujimura T, Kawana H, Okano H, et al. Applications of

- Mesenchymal Stem Cells and Neural Crest Cells in Craniofacial Skeletal Research. *STEM CELLS INT.* 2016;2016: 2849879.
- [104] Bianco P, Robey PG, Saggio I, Riminucci M. "Mesenchymal" stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): a critical discussion of their nature, identity, and significance in incurable skeletal disease. *HUM GENE THER.* 2010;21: 1057-66.
- [105] Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J CELL BIOCHEM.* 2009;106: 984-91.
- [106] Salamon A, Toldy E. The role of adult bone marrow derived mesenchymal stem cells, growth factors and carriers in the treatment of cartilage and bone defects. *J Stem Cells.* 2009;4: 71-80.
- [107] Alfaifi M, Eom YW, Newsome PN, Koo BS. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases. *J HEPATOL.* 2018.
- [108] Sayad FS, Zaminy A. Stem cell therapy for nerve injury. *World J Stem Cells.* 2017;9: 144-51.
- [109] Hall BK, Miyake T. The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. *Anat Embryol (Berl).* 1992;186: 107-24.
- [110] Rux DR, Wellik DM. Hox genes in the adult skeleton: Novel functions beyond embryonic development. *Dev Dyn.* 2017;246: 310-7.
- [111] Majidinia M, Sadeghpour A, Yousefi B. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. *J CELL PHYSIOL.* 2018;233: 2937-48.
- [112] Djouad F, Ipseiz N, Luz-Crawford P, Scholtysek C, Kronke G, Jorgensen C. PPARbeta/delta: A master regulator of mesenchymal stem cell functions. *BIOCHIMIE.* 2017;136: 55-8.
- [113] Li J, Dong S. The Signaling Pathways Involved in Chondrocyte Differentiation and Hypertrophic Differentiation. *STEM CELLS INT.* 2016;2016: 2470351.
- [114] Chen Q, Shou P, Zheng C, Jiang M, Cao G, Yang Q, et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *CELL DEATH DIFFER.* 2016;23: 1128-39.
- [115] Duque G. Bone and fat connection in aging bone. *CURR OPIN RHEUMATOL.* 2008;20: 429-34.
- [116] Gimble JM, Zvonic S, Floyd ZE, Kassem M, Nuttall ME. Playing with bone and fat. *J CELL BIOCHEM.* 2006;98: 251-66.
- [117] Nelson-Dooley C, Della-Fera MA, Hamrick M, Baile CA. Novel treatments for obesity and osteoporosis: targeting apoptotic pathways in adipocytes. *CURR MED CHEM.* 2005;12: 2215-25.
- [118] Cheung WH, Miclau T, Chow SK, Yang FF, Alt V. Fracture healing in osteoporotic bone.

- INJURY. 2016;47 Suppl 2: S21-6.
- [119] Chen Y, Alman BA. Wnt pathway, an essential role in bone regeneration. J CELL BIOCHEM. 2009;106: 353-62.
- [120] Tian L, Yu X. Lipid metabolism disorders and bone dysfunction--interrelated and mutually regulated (review). MOL MED REP. 2015;12: 783-94.
- [121] Agrawal A, Gartland A. P2X7 receptors: role in bone cell formation and function. J MOL ENDOCRINOL. 2015;54: R75-88.
- [122] Bodine PV. Wnt signaling control of bone cell apoptosis. CELL RES. 2008;18: 248-53.
- [123] Lu NZ, Collins JB, Grissom SF, Cidlowski JA. Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor. MOL CELL BIOL. 2007;27: 7143-60.
- [124] Fan L, Yin S, Zhang E, Hu H. Role of p62 in the regulation of cell death induction. APOPTOSIS. 2018.
- [125] Haneji T. Roles of PKR in differentiation and apoptosis of bone-related cells. ANAT SCI INT. 2017;92: 313-9.
- [126] Gao B, Huang Q, Jie Q, Zhang HY, Wang L, Guo YS, et al. Ginsenoside-Rb2 inhibits dexamethasone-induced apoptosis through promotion of GPR120 induction in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. STEM CELLS DEV. 2015;24: 781-90.
- [127] Xu Y, Wan W, Shou X, Huang R, You Z, Shou Y, et al. TP53INP2/DOR, a mediator of cell autophagy, promotes rDNA transcription via facilitating the assembly of the POLR1/RNA polymerase I preinitiation complex at rDNA promoters. AUTOPHAGY. 2016;12: 1118-28.
- [128] Weindel CG, Richey LJ, Bolland S, Mehta AJ, Kearney JF, Huber BT. B cell autophagy mediates TLR7-dependent autoimmunity and inflammation. AUTOPHAGY. 2015;11: 1010-24.
- [129] Wang Z, Hu J, Li G, Qu L, He Q, Lou Y, et al. PHF23 (plant homeodomain finger protein 23) negatively regulates cell autophagy by promoting ubiquitination and degradation of E3 ligase LRSAM1. AUTOPHAGY. 2014;10: 2158-70.
- [130] Li Y, Zhao Y, Hu J, Xiao J, Qu L, Wang Z, et al. A novel ER-localized transmembrane protein, EMC6, interacts with RAB5A and regulates cell autophagy. AUTOPHAGY. 2013;9: 150-63.
- [131] Shen G, Ren H, Shang Q, Qiu T, Yu X, Zhang Z, et al. Autophagy as a target for glucocorticoid-induced osteoporosis therapy. CELL MOL LIFE SCI. 2018.
- [132] Gao T, Guo W, Chen M, Huang J, Yuan Z, Zhang Y, et al. Extracellular Vesicles and Autophagy in Osteoarthritis. BIOMED RES INT. 2016;2016: 2428915.
- [133] Shen G, Ren H, Qiu T, Liang D, Xie B, Zhang Z, et al. Implications of the Interaction Between miRNAs and Autophagy in Osteoporosis. Calcif Tissue Int. 2016;99: 1-12.

- [134] Li YS, Zhang FJ, Zeng C, Luo W, Xiao WF, Gao SG, et al. Autophagy in osteoarthritis. *JOINT BONE SPINE*. 2016;83: 143-8.
- [135] Li Y, Wang J, Yue J, Wang Y, Yang C, Cui Q. High magnesium prevents matrix vesicle-mediated mineralization in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells via mitochondrial pathway and autophagy. *CELL BIOL INT*. 2018;42: 205-15.
- [136] Boya P, Codogno P, Rodriguez-Muela N. Autophagy in stem cells: repair, remodelling and metabolic reprogramming. *DEVELOPMENT*. 2018;145: .
- [137] Mahrouf-Yorgov M, Augeul L, Da SC, Jourdan M, Rigolet M, Manin S, et al. Mesenchymal stem cells sense mitochondria released from damaged cells as danger signals to activate their rescue properties. *CELL DEATH DIFFER*. 2017;24: 1224-38.
- [138] Sbrana FV, Cortini M, Avnet S, Perut F, Columbaro M, De Milito A, et al. The Role of Autophagy in the Maintenance of Stemness and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Rev*. 2016;12: 621-33.
- [139] Gao B, Han YH, Wang L, Lin YJ, Sun Z, Lu WG, et al. Eicosapentaenoic acid attenuates dexamethasone-induced apoptosis by inducing adaptive autophagy via GPR120 in murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *CELL DEATH DIS*. 2016;7: e2235.
- [140] Baker DJ, Petersen RC. Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives. *J CLIN INVEST*. 2018.
- [141] Yu Y, Schleich K, Yue B, Ji S, Lohneis P, Kemper K, et al. Targeting the Senescence-Overriding Cooperative Activity of Structurally Unrelated H3K9 Demethylases in Melanoma. *CANCER CELL*. 2018;33: 322-36.
- [142] Chen Y, Mao P, Snijders AM, Wang D. Senescence chips for ultrahigh-throughput isolation and removal of senescent cells. *AGING CELL*. 2018;17: .
- [143] Zhang W, Li J, Suzuki K, Qu J, Wang P, Zhou J, et al. Aging stem cells. A Werner syndrome stem cell model unveils heterochromatin alterations as a driver of human aging. *SCIENCE*. 2015;348: 1160-3.
- [144] Milanovic M, Fan D, Belenki D, Dabritz J, Zhao Z, Yu Y, et al. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *NATURE*. 2018;553: 96-100.
- [145] He S, Sharpless NE. Senescence in Health and Disease. *CELL*. 2017;169: 1000-11.
- [146] Wang L, Guo X, Wang J, Jiang C, Bosland MC, Lu J, et al. Methylseleninic Acid Superactivates p53-Senescence Cancer Progression Barrier in Prostate Lesions of Pten-Knockout Mouse. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2016;9: 35-42.
- [147] Gao B, Lin X, Jing H, Fan J, Ji C, Jie Q, et al. Local delivery of tetramethylpyrazine eliminates

- the senescent phenotype of bone marrow mesenchymal stromal cells and creates an anti-inflammatory and angiogenic environment in aging mice. *AGING CELL*. 2018.
- [148] Onuora S. Osteoimmunology: IgG immune complexes directly regulate bone homeostasis. *NAT REV RHEUMATOL*. 2015;11: 257.
- [149] Lian JB. Epigenetic pathways regulating bone homeostasis. *BONE*. 2015;81: 731-2.
- [150] Nollet M, Santucci-Darmanin S, Breuil V, Al-Sahlane R, Cros C, Topi M, et al. Autophagy in osteoblasts is involved in mineralization and bone homeostasis. *AUTOPHAGY*. 2014;10: 1965-77.
- [151] Kang H, Kerloc'H A, Rotival M, Xu X, Zhang Q, D'Souza Z, et al. Kcnn4 is a regulator of macrophage multinucleation in bone homeostasis and inflammatory disease. *CELL REP*. 2014;8: 1210-24.
- [152] Zhen G, Cao X. Targeting TGFbeta signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis. *TRENDS PHARMACOL SCI*. 2014;35: 227-36.
- [153] Crane JL, Cao X. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF-beta signaling in bone remodeling. *J CLIN INVEST*. 2014;124: 466-72.
- [154] Crane JL, Cao X. Function of matrix IGF-1 in coupling bone resorption and formation. *J Mol Med (Berl)*. 2014;92: 107-15.
- [155] Kode A, Obri A, Paone R, Kousteni S, Ducy P, Karsenty G. Lrp5 regulation of bone mass and serotonin synthesis in the gut. *NAT MED*. 2014;20: 1228-9.
- [156] Ferron M, McKee MD, Levine RL, Ducy P, Karsenty G. Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. *BONE*. 2012;50: 568-75.
- [157] Ducy P. The role of osteocalcin in the endocrine cross-talk between bone remodelling and energy metabolism. *DIABETOLOGIA*. 2011;54: 1291-7.
- [158] Ducy P. 5-HT and bone biology. *CURR OPIN PHARMACOL*. 2011;11: 34-8.
- [159] Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del FA, DePinho RA, Teti A, et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *CELL*. 2010;142: 296-308.
- [160] Phetfong J, Sanvoranart T, Nartprayut K, Nimsanor N, Seenprachawong K, Prachayasittikul V, et al. Osteoporosis: the current status of mesenchymal stem cell-based therapy. *CELL MOL BIOL LETT*. 2016;21: 12.
- [161] Cotts KG, Cifu AS. Treatment of Osteoporosis. *JAMA*. 2018;319: 1040-1.
- [162] Collison J. Osteoporosis: Teriparatide preferable for fracture prevention. *NAT REV RHEUMATOL*. 2018;14: 4.
- [163] Lewis JR, Schousboe JT, Prince RL. Romosozumab versus Alendronate and Fracture Risk in

- Women with Osteoporosis. *N Engl J Med*. 2018;378: 194-5.
- [164] Song GG, Lee YH. Romosozumab versus Alendronate and Fracture Risk in Women with Osteoporosis. *N Engl J Med*. 2018;378: 194.
- [165] Ball AN, Donahue SW, Wojda SJ, McIlwraith CW, Kawcak CE, Ehrhart N, et al. The challenges of promoting osteogenesis in segmental bone defects and osteoporosis. *J ORTHOP RES*. 2017.
- [166] Ma Y, Qi M, An Y, Zhang L, Yang R, Doro DH, et al. Autophagy controls mesenchymal stem cell properties and senescence during bone aging. *AGING CELL*. 2018;17: .
- [167] Busacchi P, Gnudi S, Mongiorgi R, Pelusi G, Gentile G. Evaluation by means of radius bone densitometry of the fracture risk due to osteoporosis in post-menopause. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 1991;18: 181-3.
- [168] Sambrook PN. Glucocorticoid osteoporosis. *Curr Pharm Des*. 2002;8: 1877-83.
- [169] Ishimi Y. Osteoporosis and Lifestyle. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2015;61 Suppl: S139-41.
- [170] Giannotti S, Bottai V, Dell'Osso G, De Paola G, Bugelli G, Pini E, et al. Disuse osteoporosis of the upper limb: assessment of thirty patients. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2013;10: 129-32.
- [171] Wang R, Yang Y, Sheng M, Bu D, Huang F, Liu X, et al. Phenotype-Genotype Association Analysis of ACTH-Secreting Pituitary Adenoma and Its Molecular Link to Patient Osteoporosis. *INT J MOL SCI*. 2016;17: .
- [172] Yu TM, Lin CL, Shu KH, Liu YL, Chen CH, Huang ST, et al. Increased risk of cardiovascular events in end-stage renal disease patients with osteoporosis: a nationwide population-based cohort study. *Osteoporos Int*. 2015;26: 785-93.
- [173] Holm JP, Hyldstrup L, Jensen JB. Time trends in osteoporosis risk factor profiles: a comparative analysis of risk factors, comorbidities, and medications over twelve years. *ENDOCRINE*. 2016;54: 241-55.
- [174] Padova G, Borzi G, Incorvaia L, Siciliano G, Migliorino V, Vetri M, et al. Prevalence of osteoporosis and vertebral fractures in acromegalic patients. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2011;8: 37-43.
- [175] de Boissieu P, Trenque T. Denosumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5: 767-8.
- [176] Levin VA, Jiang X, Kagan R. Estrogen therapy for osteoporosis in the modern era. *Osteoporos Int*. 2018.
- [177] Passos-Soares JS, Vianna M, Gomes-Filho IS, Cruz SS, Barreto ML, Adan LF, et al. Association between osteoporosis treatment and severe periodontitis in postmenopausal women.

- MENOPAUSE. 2017;24: 789-95.
- [178] Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017;5: 898-907.
- [179] Brown C. Osteoporosis: Staying strong. *NATURE.* 2017;550: S15-7.
- [180] Beekman KM, Veldhuis-Vlug AG, den Heijer M, Maas M, Oleksik AM, Tanck MW, et al. The effect of raloxifene on bone marrow adipose tissue and bone turnover in postmenopausal women with osteoporosis. *BONE.* 2017.
- [181] Sugiyama T, Oda H. Osteoporosis Therapy: Bone Modeling during Growth and Aging. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;8: 46.
- [182] McGarvey C, Coughlan T, O'Neill D. Ageism in Studies on the Management of Osteoporosis. *J AM GERIATR SOC.* 2017;65: 1566-8.
- [183] Baig N, Khan MZ. Analysis and detection of microporosities in aging bones in context to pharmaceutical treatment: A study in line of osteoporosis. *PAK J PHARM SCI.* 2016;29: 1763-7.
- [184] Wu X, Wei D, Sun B, Wu XN. Poor medication adherence to bisphosphonates and high self-perception of aging in elderly female patients with osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2016;27: 3083-90.
- [185] Paschalis EP, Fratzl P, Gamsjaeger S, Hassler N, Brozek W, Eriksen EF, et al. Aging Versus Postmenopausal Osteoporosis: Bone Composition and Maturation Kinetics at Actively-Forming Trabecular Surfaces of Female Subjects Aged 1 to 84 Years. *J BONE MINER RES.* 2016;31: 347-57.
- [186] Sambrook PN, Roux C, Devogelaer JP, Saag K, Lau CS, Reginster JY, et al. Bisphosphonates and glucocorticoid osteoporosis in men: results of a randomized controlled trial comparing zoledronic acid with risedronate. *BONE.* 2012;50: 289-95.
- [187] Geusens PP, de Nijs RN, Lems WF, Laan RF, Struijs A, van Staa TP, et al. Prevention of glucocorticoid osteoporosis: a consensus document of the Dutch Society for Rheumatology. *ANN RHEUM DIS.* 2004;63: 324-5.
- [188] Reid IR. Glucocorticoid osteoporosis--mechanisms and management. *EUR J ENDOCRINOL.* 1997;137: 209-17.
- [189] Reid IR, Veale AG, France JT. Glucocorticoid osteoporosis. *J ASTHMA.* 1994;31: 7-18.
- [190] Hamilos DL. Glucocorticoid osteoporosis: a need for greater awareness and action. *J ASTHMA.* 1994;31: 1-6.
- [191] Li C, Chai Y, Wang L, Gao B, Chen H, Gao P, et al. Programmed cell senescence in skeleton

- during late puberty. *NAT COMMUN.* 2017;8: 1312.
- [192] Farr JN, Xu M, Weivoda MM, Monroe DG, Fraser DG, Onken JL, et al. Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. *NAT MED.* 2017;23: 1072-9.
- [193] Kim HN, Chang J, Shao L, Han L, Iyer S, Manolagas SC, et al. DNA damage and senescence in osteoprogenitors expressing *Osx1* may cause their decrease with age. *AGING CELL.* 2017;16: 693-703.
- [194] Farr JN, Khosla S. Skeletal changes through the lifespan--from growth to senescence. *NAT REV ENDOCRINOL.* 2015;11: 513-21.
- [195] Marie PJ. Bone cell senescence: mechanisms and perspectives. *J BONE MINER RES.* 2014;29: 1311-21.
- [196] Ma QL, Fang L, Jiang N, Zhang L, Wang Y, Zhang YM, et al. Bone mesenchymal stem cell secretion of sRANKL/OPG/M-CSF in response to macrophage-mediated inflammatory response influences osteogenesis on nanostructured Ti surfaces. *BIOMATERIALS.* 2018;154: 234-47.
- [197] Das N, Kumar TR. Molecular regulation of follicle-stimulating hormone synthesis, secretion and action. *J MOL ENDOCRINOL.* 2018;60: R131-55.
- [198] Davies LC, Heldring N, Kadri N, Le Blanc K. Mesenchymal Stromal Cell Secretion of Programmed Death-1 Ligands Regulates T Cell Mediated Immunosuppression. *STEM CELLS.* 2017;35: 766-76.
- [199] Mi F, Gong L. Secretion of interleukin-6 by bone marrow mesenchymal stem cells promotes metastasis in hepatocellular carcinoma. *Biosci Rep.* 2017;37: .
- [200] Zhou Y, Huang R, Fan W, Prasad I, Crawford R, Xiao Y. Mesenchymal stromal cells regulate the cell mobility and the immune response during osteogenesis through secretion of vascular endothelial growth factor A. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016.
- [201] Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *STEM CELL RES THER.* 2018;9: 63.
- [202] Cosenza S, Toupet K, Maumus M, Luz-Crawford P, Blanc-Brude O, Jorgensen C, et al. Mesenchymal stem cells-derived exosomes are more immunosuppressive than microparticles in inflammatory arthritis. *THERANOSTICS.* 2018;8: 1399-410.
- [203] Vonk LA, van Dooremalen S, Liv N, Klumperman J, Coffey PJ, Saris D, et al. Mesenchymal Stromal/stem Cell-derived Extracellular Vesicles Promote Human Cartilage Regeneration In Vitro. *THERANOSTICS.* 2018;8: 906-20.
- [204] Krajewska-Wlodarczyk M, Owczarczyk-Saczonek A, Placek W, Osowski A, Wojtkiewicz J.

- Articular Cartilage Aging-Potential Regenerative Capacities of Cell Manipulation and Stem Cell Therapy. *INT J MOL SCI*. 2018;19: .
- [205] Jayasuriya CT, Chen Y, Liu W, Chen Q. The influence of tissue microenvironment on stem cell-based cartilage repair. *Ann N Y Acad Sci*. 2016;1383: 21-33.
- [206] Wang W, Wang Y, Deng G, Ma J, Huang X, Yu J, et al. Transplantation of Hypoxic-Preconditioned Bone Mesenchymal Stem Cells Retards Intervertebral Disc Degeneration via Enhancing Implanted Cell Survival and Migration in Rats. *STEM CELLS INT*. 2018;2018: 7564159.
- [207] Du C, Jiang M, Wei X, Qin J, Xu H, Wang Y, et al. Transplantation of human matrix metalloproteinase-1 gene-modified bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates CCL4-induced liver fibrosis in rats. *INT J MOL MED*. 2018.
- [208] Gao B, Huang Q, Lin YS, Wei BY, Guo YS, Sun Z, et al. Dose-dependent effect of estrogen suppresses the osteo-adipogenic transdifferentiation of osteoblasts via canonical Wnt signaling pathway. *PLOS ONE*. 2014;9: e99137.
- [209] Chen KG, Johnson KR, McKay R, Robey PG. Concise Review: Conceptualizing Paralogous Stem-Cell Niches and Unfolding Bone Marrow Progenitor Cell Identities. *STEM CELLS*. 2018;36: 11-21.
- [210] Xie H, Cui Z, Wang L, Xia Z, Hu Y, Xian L, et al. PDGF-BB secreted by preosteoclasts induces angiogenesis during coupling with osteogenesis. *NAT MED*. 2014;20: 1270-8.
- [211] Chang H, Docheva D, Knothe UR, Knothe TM. Arthritic periosteal tissue from joint replacement surgery: a novel, autologous source of stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3: 308-17.
- [212] Tortelli F, Tasso R, Loiacono F, Cancedda R. The development of tissue-engineered bone of different origin through endochondral and intramembranous ossification following the implantation of mesenchymal stem cells and osteoblasts in a murine model. *BIOMATERIALS*. 2010;31: 242-9.

个人简历和研究成果

个人简介:

高博, 男, 汉族, 1989 年 8 月出生, 陕西西安人。

概要: 2012 年以全国统一研究生入学考试总分 404 分, 全校第四、骨科第一的成绩考入第四军医大学西京医院骨科进行研究生阶段的学习, 同年通过答辩被确定为第四军医大学直博生。2016-2017 年受国家留学基金委资助赴美国约翰霍普金斯医学院学习 21 个月。在读期间共发表 SCI 31 篇, 其中以第一/共一作者发表 SCI 17 篇, 4 年被引用 235 次; 已授权国家专利 4 项, 发明成果获陕西省研究生创新成果展一等奖; 2018 年通过诺贝尔奖获得者大会委员会选拔, 成为全国 30 名参加第 68 届德国林岛诺贝尔奖获得者大会的博士生之一(骨科领域唯一入选)。

学习和工作经历:

2007.09—2012.07	就读于西安医学院临床医学系	本科
2012.09—至今	就读于空军军医大学西京医院骨三科	直博生
2016.01—2017.11	就读于美国约翰霍普金斯医学院骨科	联合培养

发表论文:

第一作者:

1. **Gao B** et al. Local delivery of Tetramethylpyrazine eliminates the senescent phenotype of bone marrow Mesenchymal Stromal cells and creates an anti-inflammatory and angiogenic environment in aging mice. **Aging Cell**. 2018 Feb 28. doi: 10.1111/accel.12741. (IF: 6.714).
2. **Gao B** et al. Eicosapentaenoic acid attenuates Dexamethasone-induced apoptosis by inducing adaptive autophagy via GPR120 in murine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Cell Death & Disease**. 2016 May (2016) 7, e2235; doi:10.1038. (IF: 5.965).
3. **Gao B** et al. A bi-potential mediator to modulate the osteogenic and adipogenic differentiation of BMMSCs. **Sci Rep**. 2015 Sep. DOI: 10.1038/srep14080 (IF: 5.228).

4. **Gao B** et al. Ginsenoside-Rb2 inhibits dexamethasone-induced apoptosis through promotion of GPR120 induction in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells Dev.** 2014 Oct 14. (IF: 4.202).
5. **Gao B** et al. Dose-Dependent Effect of Estrogen Suppresses the Osteo-Adipogenic Transdifferentiation of Osteoblasts via Canonical Wnt Signaling Pathway. **PLoS One.** 2014 Jun 11;9(6):e99137. (IF: 3.234).
6. **Gao B** et al. Dose-response estrogen promotes osteogenic differentiation via GPR40 (FFAR1) in murine BMSCs. **Biochimie.** 2015 Mar;110:36-44. doi: 10.1016/j.biochi.2015.01.001. (IF: 3.112).
7. **Gao B** et al. Transdifferentiation between bone and fat on bone metabolism. **Int J Clin Exp Pathol** 2014;7(5):1834-1841. (IF: 1.891).
8. **Gao B** et al. Macrophage-lineage Trap⁺ Cells Essential for Periosteum-Derived Cell Bone Formation and Regeneration. **Nat Cell Biol.** (IF:20.06). Under Review.

共同第一作者:

1. Jing H, Su X, **Gao B**, et al. Epigenetic inhibition of Wnt pathway suppresses osteogenesis of BMSCs during osteoporosis. **Cell Death & Disease.** 2018 May (2016) 7, e2235; doi:10.1038. (IF: 5.965).
2. Huang Q, **Gao B**, et al. Ophiopogonin D: A new herbal agent against osteoporosis. **Bone.** 2015 May;74:18-28. doi: 10.1016/j.bone.2015.01.002. Epub 2015 Jan 10. (IF: 4.14).
3. Huang Q, **Gao B**, et al. Ginsenoside-Rb2 displays anti-osteoporosis effects through reducing oxidative damage and bone-resorbing cytokines during osteogenesis. **Bone.** 2014 Sep;66:306-14. doi: 10.1016/j.bone.2014.06.010. (IF: 4.14).
4. Huang Q, Shi Jun, **Gao B**, et al. Gastrodin: an ancient Chinese herbal medicine as a source for anti-osteoporosis agents via reducing reactive oxygen species. **Bone.** 2015 Apr;73:132-44. doi: 10.1016/j.bone.2014.12.059. (IF: 4.14).
5. Wang L, Zhang H, **Gao B**, et al. Tetramethylpyrazine Protects Against Glucocorticoid-Induced Apoptosis by Promoting Autophagy in Mesenchymal Stem Cells and Improves Bone Mass in Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Rats. **Stem Cells Dev.** 2017 Mar 15;26(6):419-430. doi: 10.1089/scd.2016.0233. Epub 2017 Jan 4. (IF: 4.202).

6. Huang Q, **Gao B**, et al. Protective effects of myricitrin against osteoporosis via reducing reactive oxygen species and bone-resorbing cytokines. **Toxicol Appl Pharmacol**. 2014 Nov 1;280(3):550-60. doi: 10.1016/j.taap.2014.08.004. (IF: 3.791).
7. Zhang Y, **Gao B**, et al. Effect of Hypotensive Resuscitation with a Novel Combination of Fluids in a Rabbit Model of Uncontrolled Hemorrhagic Shock. **PLoS One**. 2013 Jun 21;8(6):e66916. doi: 10.1371/journal.pone.0066916. (IF: 3.234).
8. Li Q, **Gao B**, et al. The assessment of health-related quality of life and related factors in Chinese elderly patients undergoing chemotherapy for advanced cancer: a cross-sectional study. **Eur J Oncol Nurs**. 2014 Aug;18(4):425-35. doi: 10.1016/j.ejon.2014.03.005. (IF: 1.826).
9. Han Y, **Gao B**, et al. Expression of CD147, PCNA, VEGF, MMPs and their clinical significance in the giant cell tumor of bones. **Int J Clin Exp Pathol**. 2015 Jul 1;8(7):8446-52. (IF: 1.891).
10. Zhang Y, **Gao B**, et al. Topical and effective hemostatic medicines in the battlefield. **Int J Clin Exp Med**. 2015 Jan 15;8(1):10-9. eCollection 2015. Review. (IF: 1.075).

参与文章(仅列出代表性文章):

1. Wang X, Li F, Xie L, Crane J, Zhen G, Mishina Y, Deng R, **Gao B**, Chen H, Liu S, Yang P, Gao M, Tu M, Wang Y, Wan M, Fan C, Cao X. et al. Inhibition of overactive TGF- β attenuates progression of heterotopic ossification in mice. **Nat Commun**. 2018 Feb 7;9(1):551. doi: 10.1038/s41467-018-02988-5 (IF: 12.124).
2. Li C, Chai Y, Wang L, **Gao B**, Chen H, Gao P, Zhou FQ, Luo X, Crane JL, Yu B, Cao X, Wan M. Programmed cell senescence in skeleton during late puberty. **Nat Commun**. 2017 Nov 3;8(1):1312. doi: 10.1038/s41467-017-01509-0 (IF: 12.124).
3. Sun Z, Luo B, Liu Z, Huang L, Liu B, Ma T, **Gao B**, Liu ZH, Chen YF, Huang JH, Luo Z. Effect of perfluorotributylamine-enriched alginate on nucleus pulposus cell: Implications for intervertebral disc regeneration. **Biomaterials**. 2016 Mar; 82:34-47. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.12.013. Epub 2015 Dec 19. (IF: 8.402).

发明专利(授权及公开):

1. 罗卓荆, **高博**, 黄强, 杨柳, 刘建, GPR120 激动剂 TUG891 防治骨质疏松的应用, 2014.11.05, 中国, CN104127874A。

2. 刘建,黄强,高博,杨柳,罗卓荆,柴胡皂苷 a 防治骨质疏松的应用,2014.07.23, 中国, CN103933055A。
3. 高博,杨柳,罗卓荆,王哲,林希圣,范静,胡雅茜,卢玮光,川芎嗪防治干 细胞衰老的应用,(已公开,公开日:2017.12.08。公开号:CN107441093A)

实用新型专利(授权):

1. 刘喜文,高博,王娟娟,一种急救输液装置及其组成的急救输液箱,2014.04.09, 中国, CN203525066U。
2. 刘喜文,高博,王娟娟,一种创伤现场伤情评估卡,2013.12.04,中国, CN104127874A。

参编书籍:

1. 《中国医师协会定期考核骨科教程丛书》
2. 《矿化医学》

参译书籍:

1. 《骨科手术入路》
2. 《洛克伍德-格林成人骨折》
3. 《骨科门诊急诊技术操作手册》
4. 《骨与关节影像学》

表彰奖励:

1. 通过诺贝尔奖获得者大会委员会选拔,参加第68届诺贝尔奖获得者大会,2018, 德国林岛
2. 美国骨研究学术大会(ORS)Best Poster, 2017, 美国圣地亚哥
3. 中华医学会骨科分会基础组优秀论文一等奖,2015,北京
4. 中华医学会骨质疏松与骨矿盐学术会议优秀论文一等奖,2015,郑州
5. 第三届国际牙与骨发育大会优秀讲者,2014,福建
6. 第36届世界骨科大会优秀壁报,2015,广州

7. 全国临床技能大赛西北西南赛区二等奖，2012，西安
8. 全国医学人文英语论坛二等奖，2015，上海
9. 中华医学会骨科基础青年研究三等奖，2015，北京
10. 陕西省研究生创新成果展一等奖，2016
11. 第四军医大学研究生学习成才标兵（2015 年度）
12. 第四军医大学研究生优秀毕业生（2014 年度）
13. 第四军医大学研韵杯篮球赛一等奖（2017 年度）
14. 研究生英语演讲比赛三等奖（2014 年度）
15. 第四军医大学研究生入学一等奖学金
16. 第四军医大学研究生硕士一等奖学金
17. 第四军医大学研究生博士二等奖学金

致 谢

六年前，我从地方大学以总成绩 404 分考入第四军医大学西京医院骨科，并荣幸的加入我的导师罗卓荆教授开办的“罗汉堂”。在这六年里，“罗汉堂”提供的无微不至的关心与帮助始终督促着我，使我一步步从一个大学毕业年少无知的学生，成长为一位具有独立思考并兼具人格魅力的青年学者；在这六年里，“罗汉堂”给与的无与伦比的美好回忆，帮助我的足迹踏遍了中国与美国的大江南北；在这六年里，“罗汉堂”付出的可比拟的心血与汗水鞭策我在工作与生活中努力做到最好。光阴如梭，这六年转瞬即逝。在这里，我以最诚挚的心，感谢我的恩师，大医精诚、大爱无疆的罗卓荆教授，是您给予机会让我与骨科领域最优秀的人才共事，我的研究与小小的成就，离不开您自始至终的支持与无微不至的关怀。在此，请允许我代表我的家人对六年以来你们给予我的关怀表示最诚挚的谢意！

感谢骨科实验室的王春梅教授、白建萍老师、吕荣老师、李丹老师为我提供舒适的工作环境，及各种实验技术方面的指导。

感谢西京骨科医院三病区王哲教授、李新奎教授、叶正旭教授、闫铭教授、梁伟教授、胡学昱教授、黄景辉教授、耿丹女士、夏丽玉女士、窦艳洁女士及所有工作人员在我六年学习工作当中提供的帮助与指导。

感谢课题组成员郭云山博士、韩跃虎博士、魏铂沅博士、王龙博士、孙振博士、黄强博士、厉晓杰博士、史俊博士、张洪洋博士、徐小龙博士、郑超博士、王金鹏博士、史淇月硕士、林希圣硕士、王迪硕士与殷金花硕士，在科研与生活中给予的帮助与支持。在此特别感谢的是我的辅导老师杨柳教授，您在科研工作中出类拔萃的技术及认真负责的态度是我学习的榜样，在科学研究探索中孜孜不倦、锲而不舍的精神，更是我追求的目标。

感谢范静女士、胡雅茜女士、李俊琴女士、高祎女士、兰利锋女士、吴拮女士、李静女士卢玮光先生以及程朋真先生等工作与生活中提供的帮助。

感谢约翰霍普金斯大学曹旭教授、万梅教授、Janet Crane 教授、哈佛大学牙学院杨英姿教授在我赴美国学习期间给予的指导与帮助。

感谢我的父亲、母亲、我爱的人以及爱我的人对我的支持和理解。是你们的不离不弃、患难与共帮助我克服一切苦难，顺利完成学业。