·药物研究·

唑来膦酸对人羊膜间充质干细胞移植治疗去卵巢大鼠骨质疏松协同效应研究

雷鸣[1] 刘晓峰[1*] 刘春颖[2] 郑文奎[1] 孙琳[3] 曹广民[4] 杨照宇[5]
1. 河北大学附属医院骨科,石家庄 071000
2. 河北大学医学部药理教研室,石家庄 071000
3. 保定市容城县人民医院放射科 071700
4. 保定市容城县人民医院骨科 071700
5. 保定市蠡县医院外科 071400

中图分类号: R 681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 09-1143-06

摘要: 目的 探索唑来膦酸联合人羊膜间充质干细胞移植对去卵巢骨质疏松协同效应研究。**方法** 选择雌性未孕的 Wistar 大鼠 45 只,完全随机分组分为假手术组、模型组及实验组,每组各 15 只。术后第 7 天,行唑来膦酸灌胃 + 尾静脉注射 AM-MSCs 液(假手术组除外),连续干预 13 周,于末次干预后 24 h,处死大鼠并采集标本。每周测定 1 次各组大鼠的体质量;双能 X 线吸收骨密度仪分别测定左侧股骨中点、远端和近端骨密度;用原子吸收法测定其骨钙含量;干预 13 周后 ELISA 法检测血清 25-羟基维生素 D(25-HVD)、I 型胶原 C 端肽(CTX-I)、骨特异性碱性磷酸酶(BAP)、抗酒石酸酸性磷酸酶 5b(TRAP5b)的表达变化;检测各组大鼠生物力学性能的变化;RT-PCR 技术检测椎骨中转化生长因子 β1(TGF-β1)的基因表达。**结果** 假手术组大鼠体重逐渐增加,符合动物自然生长规律,模型组于造模后两个月开始,体重却明显高于假手术组,实验组体重渐增,与假手术组相近。与假手术组比较模型组的骨密度和骨钙含量均降低,与模型组比较,实验组的骨密度和骨钙含量含量均升高。与假手术组比较,模型组血清 25-HVD、CTX-I、BAP、TRAP5b 的表达显著降低,与模型组比较,实验组显著升高。生物法力学检测显示,假手术组的极限载荷、极限应力和弹性模量比模型组有显著增高($P < 0.05$),实验组的极限载荷和弹性模量比假手术组有显著增高($P < 0.05$)。与假手术组、模型组比较,实验组 TGF-β1m RNA 的表达明显上调($P < 0.05$)。**结论** 唑来膦酸协同人羊膜间充质干细胞移植具有较好改善去卵巢大鼠骨质疏松症的作用。

关键词: 人羊膜间充质干细胞(AM-MSCs);唑来膦酸;移植;去卵巢;大鼠;骨质疏松

Synergistic effect of zoledronic acid on human amniotic mesenchymal stem cell transplantation for treatment osteoporosis in ovariectomized rats

LEI Ming[1], LIU Xiaofeng[1], LIU Chunying[2], ZHENG Wenkui[1], SUN Lin[3], CAO Guangmin[4], YANG Zhaoyu[5]
1. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Hebei University, 071000
2. Department of Pharmacology, Health Science Center, Hebei University, 071000
3. Department of Radiology, People's Hospital of Baoding, Rongcheng County, Baoding 071700
4. Department of Orthopedics, People's Hospital of Rongcheng County, Baoding 071700
5. Department of Surgery, Lixian Hospital, 071400
Corresponding author: LIU Xiaofeng, Email: 114025958@qq.com

Abstract: Objective To investigate the synergistic effect of zoledronic acid on human amniotic mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of osteoporosis in ovariectomized rats. **Methods** Forty-five female non-pregnant Wistar rats were randomly divided into sham operation group, model group, and experimental group, with 15 rats in each group. Stomach irrigation of zoledronic acid and tail-vein injection of AM-MSCs (except in sham operated group) were performed after 7-day of the operation, and continued for 13 weeks. Twenty-four hours after the last intervention, the rats were killed and specimens were collected. The rat body weight was measured weekly. Bone mineral density (BMD) of the middle, distal, and proximal left femur was measured using dual energy X-ray absorptiometry. Calcium content of the bone was determined with atomic absorption method.

* 通讯作者: 刘晓峰,Email: 114025958@qq.com

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Changes of serum 25 HVD, CTX I, BAP, and TRAP5b were detected using ELISA method after intervention for 13 week. The biomechanical properties of rats were detected. RT-PCR was used to detect TGF-β1 gene expression in the vertebrae. **Results** The weight of rats in the sham operation group increased gradually, in line with the natural growth. The weight was significantly higher in model group than that in the sham operation group in 2 months after modeling. The weight increase in the experiment group was similar with the sham operation group. BMD and calcium content were lower in model group than in sham group. BMD and calcium content were higher in the experimental group than in the model group. Serum 25 HVD, CTX I, BAP, and TRAP5b significantly decreased in model group comparing with those in the sham operation group. They increased significantly in the experimental group comparing with those in the model group. Mechanical biological detection showed that the limit load, limit stress, and elastic modulus increased significantly in sham operation group than in the model group ($P<0.05$). The limit load and elastic modulus in the experimental group significantly increased than in the sham operation group ($P<0.05$). TGF-β1 mRNA expression significantly increased in experimental group than in the sham operation group and model group ($P<0.05$). **Conclusion** Zoledronate phosphoric acid has beneficial effect in ovariectomized rats with osteoporosis when works together with amniotic mesenchymal stem cell transplantation.

Key words: AM-MSCs; Zoledronic acid; Transplantation; Ovariectomized; Rats; Osteoporosis

骨质疏松症(osteoporosis,OP)是临床中较为常见的一种疾病,多呈进行性发展,由多种因素导致,发病机制复杂,对其相关研究从未停止。其主要特征为骨骼结构发生改变,同正常骨相比,OP 患者的骨的脆性增加,强度减低,所以同正常骨相比易发生骨折。OP 在中老年人群中多见,特别是月经完全停止的妇女。OP 患者可反复发生骨折,对患者的生活质量造成了严重的影响,为社会及家庭均带来较大的经济负担[1-2]。随着社会的发展与进步,老龄化社会的到来,发病人数越累来越多,故防治 OP 已经成为一个迫切需要解决的问题[3]。近年来关于 OP 的相关研究很多,寻找的治疗方法也很多,有药物治疗法,中医中药治疗,中医针灸治疗,干细胞移植治疗等[4-5]。

干细胞的种类很多,一直以来都是临床研究的热点,目前对于干细胞的研究越来越深入,对各类干细胞的研究参差不齐。人羊膜间充质干细胞(AM-MSCs)是其中的一种,因此其特性与其他干细胞相似,即具有在特定条件下可以分化为各种细胞的能力,这种特性的存在,使其为各种疾病的治疗提供了新的思路[6-7]。AM-MSCs 来源于羊膜组织,是孕妇产生的一种废弃物,只要征得孕妇同意其收集容易,不受伦理道德的限制,来源广泛,因为存在以上优点故 AM-MSCs 成为近几年的研究又一热点,其在包括免疫相关的疾病在内的多种疾病的治疗方面取得了令人瞩目的成绩[8-10]。切除雌性大鼠的卵巢使得大鼠雌激素分泌减少,从而造成 OP 模型与女性绝经后雌激素分泌减少引起的 OP 特征相似,因此可以用这种方法造模来研究绝经后 OP。因 OP 致病因素多,发病机制复杂,所以很难使用一种药物来解决 OP 的所有问题。所以本研究旨在联合应用唑来膦酸及 AM-MSCs 移植治疗去卵巢大鼠 OP,观察其作用效果。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究为随机对照动物实验,实验于 2014 年 3 月 - 2015 年 10 月在河北医科大学动物实验室完成。LG-DMEM(Gibico 公司)、胰蛋白酶(Amreseo 公司)、体重计、双能 X 射线骨密度测量仪(美国 GE 公司)、骨特异性碱性磷酸酶(BAP)酶联免疫测定试剂盒、大鼠 I 型胶原 C 端肽(CTX-I)检测试剂盒、大鼠抗酒石酸酸性磷酸酶 5b(TRAP5b)检测试剂盒(上海斯信生物科技有限公司)、唑来膦酸购于泰安大凡神农制药有限公司,批号:20070716。

1.2 方法

1.2.1 AM-MSCs 的培养: 将 hAMSCs 细胞冻存管从液氮中取出,迅速放入 37℃ 水浴中解冻,注意避免冻存管顶部沾水而受污染。将细胞加入有培养基的离心管中,1500 r/min 离心 5 min,去掉上清,接种到新的培养基皿中,置入体积分数为 0.05 的 CO_2 培养箱内培养。每三、或四天半量换液 1 次,7 ~ 10d 传代 1 次。继续观察,待贴壁细胞融合完全后对其进行消化并进行传代,将第二代的细胞分别接种到 2 个 6 孔板上,调整细胞密度使其满足 1×10^5 孔,当再次融合达 80% 时,先后加入胰蛋白酶、培养基,经过消化后再次进行离心,最后进行细胞传代及光学显微镜观察实验室取传 3 代的 hAMSCs 细胞进入实验。

1.2.2 模型的建立与分组: 选择 45 只 Wistar 大鼠,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

均为雌性、未孕，每只大鼠体重 控制在 215 ~ 255 g，由河北医科大学动物实验室提供，所有大鼠均在相同条件下进行饲养。采用完全随机法。将 45 只大鼠平均分成 3 组，分别为假手术组、模型组及实验组，各组均为 15 只。将各组大鼠采用吸入乙醚法进行麻醉，麻醉后将大鼠固定，经皮肤消毒后，选择腰椎后侧正中为切口切开皮肤，分离两旁肌肉，打开腹膜，找到双侧卵巢，模型组及实验组两组大鼠双侧卵巢需完全切除，而对假手术组大鼠的处理则为相同部位切开皮肤后，在卵巢周围的周边部位切下少量的组织，而不切除卵巢，操作完成后向腹腔中撒入青霉素粉末，然后相同的方法缝合皮肤。手术结束后 7d 大鼠伤口愈合后，对实验组大鼠给予唑来膦酸（10 mL · kg^{-1} 灌胃）+ 尾静脉注射 AM-MSCs 液进行干预，干预时长为 13 周。

1.2.3 测定各组大鼠的体质量及骨密度

从造模后 7 d 开始，每周都测定一次各只大鼠体重，直至造模后的第 13 周将大鼠处死时结束。具体操作过程为，将体重计置于桌面上，置“0”后将事先准备好的小桶置于体重计上，记录小桶重量，然后分别将各组各只大鼠置于小桶中，记录体重计读数，将每次读数减去小桶重量，分别对每只大鼠进行两次体质量测定，为确保测定结果的准确性将两次测定结果的平均值做为大鼠体质量[15]。在造模后的第 13 周后将各组大鼠处死，固定后，无菌条件下将大鼠左侧股骨取出，标记出大鼠股骨中点，分别对大鼠左侧股骨中点、近端及远端分别进行骨密度测定。具体操作方法为将大鼠股骨中点、远近端分别置于双能 X 线吸收骨密度仪进行测定记录测定值结果用于最后数据比较。

1.2.4 ELISA 法检测血清 25-HVD、CTX-I、BAP、TRAP5b 的变化： 实验组大鼠经过 13 周的干预后，将各组大鼠取仰卧位，固定后，用注射器经大鼠境外静脉进行采血，将注射器中抽出的血液注入离心管，把离心机调至 3000 转/分，打开离心机将离心管放入进行离心，15 min 后用胶头滴管将离心管中的上清液吸出，采用 ELISA 法对血清 25-HVD、CTX-I、BAP、TRAP5b 进行测定，所有操作均按照试剂盒的说明书进行。对各项结果进行记录。

1.2.5 RT-PCR 检测 TGF-β1 基因表达情况： 时间方法同上，抽取各组大鼠血液，将各组大鼠血液经过特定处理后从中提取出总的 RNA，从中取出 2ul 进行逆转录，结果为 cDNA。将逆转录得到的片段作为 PCR 反应模板进行 PCR 反应，整个操作按照相关试剂盒说明进行。TGF-β1 引物：上游 5′-TTTCCCGATATTCGGGCAGC-3′，下游 5′-GTACATGAGCAGGCTCAGCC-3′。β-actin 引物：上游 5′-TGGTGGGTATGGGTCAGAAGGACTC-3′，下游 5′-CATG-GCTGGGGTGTTGAAGGTCTCA-3′。PCR 反应条件为：在 94℃ 条件下变性，时长为 1 min，然后在 56℃ 条件下进行退火，退火时长为 0.5 min，最后进行延伸，延伸所需条件为 72℃，延伸时长为 1 min，共经过 30 个循环。

1.2.6 大鼠生物力学性能及骨钙含量检测： 模型建立第 13 周后，经过最后一次干预后 24 h，以颈部脱臼法将各组大鼠处死，将大鼠固定在支架上，用手术刀将大鼠股骨取出，将股骨上附着的组织剔除干净，然后进行股骨生物力学测试，所采用的实验为三点弯曲实验，将各组大鼠处理后的股骨放在试验机上进行测试，所选择的跨距为 17 mm，加载速度为每分钟 2.0 mm，然后根据结果对其载荷-变形曲线，应力-应变曲线进行描绘[19]。采用用原子吸收法对剔除干净软组织的股骨进行钙含量的测定。

2 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行统计分析，计量资料以（$\bar{x} \pm s$）表示，采用单因素方差分析和双因素重复测量数据方差分析，组间比较采用 LSD-t 法。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 AM-MSCs 的形态观察

贴壁细胞数随培养时间的延长而逐渐增多，细胞形态也由刚开始的长梭形而逐渐发生改变，第 6 天时贴壁细胞数量可达 80% 以上，此时细胞排列紧密，细胞体较前拉长，呈漩涡状生长（图 1A）。传代生长分为不同的时期，不同时期内细胞增殖速度是不同的，细胞增殖速度在第 4 天左右是最快，当传代至第 8 代以后逐渐减慢，细胞形态变化较为明显，胞体逐渐变大使整个细胞形态呈扁平状。根据从生长曲线（图 1B）可以进行不同分期，1 ~ 3 d 为细胞生长潜伏期，此期细胞呈贴壁生长，数量逐渐增多；第 4 ~ 7d 为细胞对数生长期，此期细胞增殖速度最快；第 8 天细胞增殖速度变缓，达到平台期。

3.2 各组大鼠的体质量

分别在造模后第 7 天开始每周对大鼠体质量进行一次测定，将各组大鼠体质量最终结果进行比较结果显示，假手术组大鼠在造模结束后第 7 天至第

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

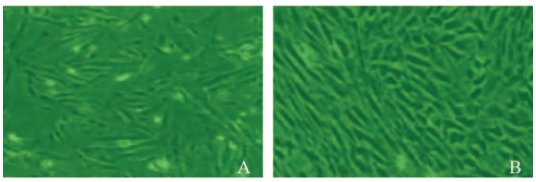

图 1 AM-MSCs 的形态观察

Fig. 1 Morphological observation of AM-MSCs.

图 1A: 第 6 天时 AM-MSCs(×200) 图 1B: 传至第 8 代后的 AM-MSCs(×200)

Figure 1A. Day 6 of AM-MSCs (×200); Figure 1B. the 8th generation of AM-MSCs (×200)

13 周体重逐渐增加,这符合动物的自然生长规律,从造模后的第 8 周开始,比较模型组与假手术组体质量,模型组显著高于假手术组;而实验组大鼠体重在这段测定时间内逐渐增加,与假手术组结果相比,二者结果相接近。如图 2。

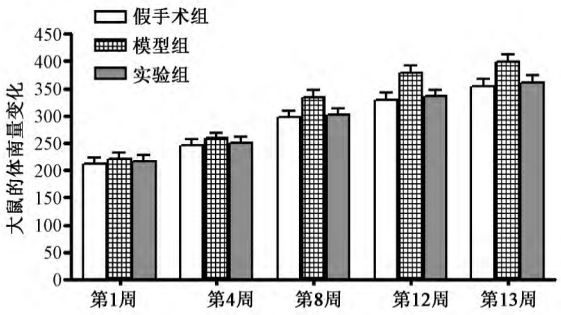

图 2 不同时间各组大鼠的体质量比较

Fig. 2 Comparison of body weight of rats among each group

3.3 双能 X 线吸收骨密度仪测定左侧股骨中点、远端和近端骨密度

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

表 1 大鼠不同组别不同部位离体骨的 BMD 值($\bar{x}\pm s$)

Table 1 BMD values of rat bone at different parts ($\bar{x}\pm s$)

组别	左侧股骨中点	远端	近端
假手术组	126. 63 ± 12. 02	82. 74 ± 11. 42	150. 31 ± 13. 42
模型组	130. 36 ± 12. 31*	86. 41 ± 11. 79*	151. 46 ± 15. 57*
实验组	136. 41 ± 13. 12#	89. 79 ± 12. 31#	156. 38 ± 16. 93#

注: 与假手术组比较,* $P<0.05$; 与模型组比较# $P<0.05$

3.4 原子吸收法测定其骨钙含量

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

表 2 各组大鼠股骨钙含量($\bar{x}\pm s$)

Table 2 The contents of calcium in the femur of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	骨钙含量(mg/g)	LSD Mean Differenc(I-J)	P 值
假手术组	15	154. 62 ± 19. 45		
模型组	15	203. 2 ± 30. 42	-12. 258	<0. 05
实验组	15	239. 4 ± 37. 67	16. 672	<0. 05

3.5 各组大鼠 25-HVD、CTX-I、BAP、TRAP5b 水平

采用 ELISA 法对大鼠血清 25-HVD、CTX-I、BAP、TRAP5b 的表达进行测定,经各组大鼠结果比较得出结论如表 3 所示,首先将假手术组、模型组两组的各项结果进行比较,比较结果显示模型组的各项指标均呈现明显的降低趋势,然后将模型组及实验组两组进行比较,比较结果显示实验组各项指标较前者则升高显著,差异具有显著性意义($P<0.05$) 。

3.6 生物力学性能的变化

各组大鼠经过不同处理后,生物力学性能均发生不同变化,采用三点弯曲实验对各组大鼠生物力

表 3 各组大鼠 血清 25-HVD、CTX-I、BAP、TRAP5b 水平($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Serum 25-HVD, CTX-I, BAP, and TRAP5b levels of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	25-HVD	CTX-I	BAP	TRAP5b
假手术组	23. 84 ± 5. 17	26. 34 ± 0. 26	0. 52 ± 0. 26	60. 74 ± 29. 12
模型组	19. 36 ± 3. 42*	12. 21 ± 0. 19*	0. 25 ± 0. 17*	48. 23 ± 12. 34*
实验组	28. 21 ± 6. 05#	23. 86 ± 0. 34#	0. 69 ± 0. 28#	69. 69 ± 26. 25#

注: 与假手术组比较,* $P<0.05$; 与模型组比较,# $P<0.05$

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

学性能的变化测定并对结果进行比较，从表 4 中可以看出，假手术组与模型组相比 N，MPa，MPa 增高显著，具有显著性差异；而将假手术组与实验组两组相比，后者的 N 和 MPa 均显著升高，差异具有显著性，$P<0.05$。

表 4 各组大鼠股骨生物力学的变化($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Biomechanical changes of the femur in rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	极限载荷 (N)	极限应力 (MPa)	弹性模量 (MPa)
假手术组	143.61±19.23	0.965±0.132	610201±20343
模型组	124.06±25.14*	0.749±0.296*	515534±59521*
实验组	157.42±14.54#	1.043±0.314#	674050±16303#

注：与假手术组比较，* $P<0.05$；与模型组比较，# $P<0.05$

3.7 RT-PCR 检测 TGF-β1 基因表达情况

以 RT-PCR 法对各组大鼠 TGF-β1 基因的表达情况进行检测，记录检测结果，将各组大鼠的检测结果进行比较，结果显示，假手术组、模型组及实验组三组中实验组的 TGF-β1 基因表达明显上调，差异具有显著性意义($P<0.05$)，见图 3。

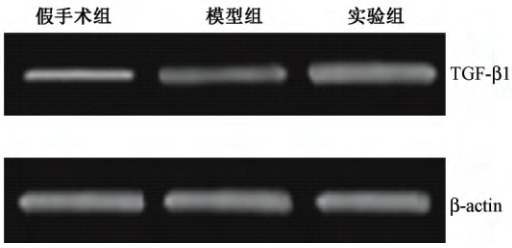

图 3A 各组大鼠 TGF-β1 基因电泳情况

Fig. 3A Electrophoresis of TGF-β1 gene in each group

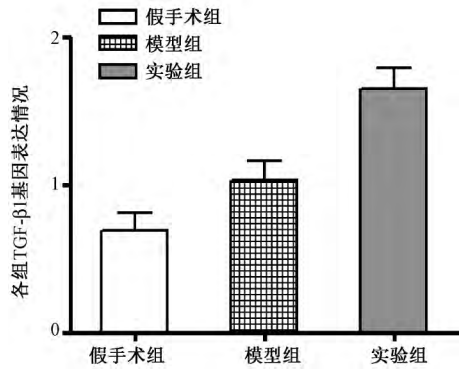

图 3B 各组大鼠 TGF-β1 基因表达水平

Fig. 3B TGF-β1 gene expression level in each group

4 讨论

正常人骨的形成由骨吸收与骨形成相互平衡决定，当各种因素影响到这种平衡，将导致骨量异常，使骨结构发生改变，从而影响骨的正常功能。绝经后骨质疏松特指女性患者在月经完全消失后，由于雌激素分泌减少，骨形成与骨吸收的平衡受到影响后，经过复杂的机制作用，导致的最终结果是骨形成与骨吸收平衡打破使骨量形成减少，从而导致的骨骼强度变小，脆性增加，所以极易发生骨折[11-14]。大量研究表明雌激素对 OP 的作用机制有以下几个方面，①其可以通过作用于相应受体而对成骨及破骨过程直接发挥作用；②其可以通过旁分泌机制产生大量的作用因子，对成骨及破骨过程产生间接的作用；③其还可以通过各种凋亡机发挥作用。通过以上作用机制使成骨作用增强，而破骨作用减弱，所以雌激素可以促进骨生成，当雌激素减少时骨生成减少即可发生 OP[15-16]。

目前随着高龄社会的到来，OP 患者也逐年增加，因 OP 患者生活质量下降给社会带来沉重负担，故对 OP 的相关研究很多，其治疗方法很多，但效果不是很理想。研究发现唑来膦酸可以改变机体激素分泌，通过这种内分泌的改变来影响成骨及破骨作用，因此对 OP 患者有较好的作用[17-18]。AM-MSCs 是一种干细胞，因此具有干细胞的特性，可以在特定条件下分化成为各种细胞[19-22]，因为具有此特性因此成为多年来临床研究热点，大量相关实验研究将其用于各种疾病的治疗中，并且已经取得了令人瞩目的成绩[23-26]。OP 发病机制复杂，所以不能用一种药物解决其所有问题，所以也有大量研究采用联合法治疗 OP，然而目前尚无相关研究将 AM-MSCs 与唑来膦酸相结合治疗 OP。唑来膦酸组分中的乌梢蛇、补骨脂、狗脊、淫羊藿等，具有祛风湿、补肾壮阳、强腰膝、强筋骨、固精纳气等作用。

本研究将这两种治疗方法联合起来治疗大鼠 OP，通过对各组大鼠进行不同处理后观察大鼠 OP 改善程度，结果显示唑来膦酸联合 AM-MSCs 移植对大鼠 OP 具有协同效应，可改善去卵巢大鼠 OP 的作用。然而目前对 AM-MSCs 的相关研究仍处于探索阶段，将 AM-MSCs 移植用于临床各种疾病的治疗仍需大量研究支持，需要不断探索，仍有许多问题需要解决。

【 参 考 文 献 】

[1] Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future [J]. Lancet, 2011, 377(9773): 1276-1287.

[2] Li N, Li XM, Xu L, et al. Comparison of QCT and DXA:

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Osteoporosis Detection Rates in Postmenopausal Women. Int JEndocrinol, 2013, 895474.

[3] Fullwood NJ. Neural stem cells, acetylcholine and Alzheimer's disease. Nat Chem Biol, 2007, 3(5): 268-273.

[4] Richy F, Schacht E, Bruyere O, et al. Vitamin D analogs versus native vitamin D in preventing bone loss and osteoporosis-related fractures-A comparative meta-analysis [J]. CalcifTissue Int, 2005, 76(3): 176-186.

[5] Ono Y. Multifunctional and potent roles of the 3-hydroxypropoxy group provide eldecalcitol's benefit in osteoporosis treatment [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2014, 139: 88-97.

[6] Piao ZF, Ding SQ, Zhang HY, et al. Shengwu Yixue Gongcheng yu Linchuang, 2010, 14(1): 15-19.

[7] Díaz-Prado S, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, et al. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. Differentiation, 2011, 81(3): 162-171.

[8] Kobayashi M, Yakuwa T, Sasaki K, et al. Multilineage potential of side population cells from human amnion mesenchymal layer. Cell Transplantation, 2008, (17): 291-301.

[9] Perin L, Sedrakyan S, Giuliani S. Protective effect of human amniotic fluid stem cells in an immunodeficient mouse model of acute tubular necrosis. PLo S One, 2010, 5(2): e9357.

[10] Einstein O, Grigoriadis N, Mizrachi Kol R, et al. Transplanted neural precursor cells reduce brain inflammation to attenuate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Exp Neurol, 2006, 198(2): 275-284.

[11] Gerdoni Z, Gallo B, Casazza S, et al. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Ann Neurol, 2007, 61(3): 219-227.

[12] Karlsson H, Samarasinghe S, Amrolia PJ, et al. Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses [J]. Blood, 2008, 112(3): 532-541.

[13] Shi MX, Li WJ, Li BZ, et al. Acupuncture treatment of osteoporosis in postmen opausal progress after the original Shengwu Gongcheng Xuebao, 2009, 25(5): 754-760.

[14] Paolo De Coppi, Georg Bartsch, Jr, M Minhaj Siddiqui, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nature biotechnology, 2007, (25) 1: 100-106.

[15] Marutle A, Ohmitsu M, Nilbratt M, et al. Modulation of human neural stem cell differentiationin Alzheimer(APP23) transgenic mice by phenserine. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(30): 12506-12511.

[16] Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, et al. Hyaluronan Mixed Esters of Butyric and Retinoic Acid Drive Cardiac and Endothelial Fate in Term Placenta Human Mesenchymal Stem Cells and Enhance Cardiac Repair in Infarcted Rat Hearts. J Biol Chem, 2007, 282: 14243-14252.

[17] Alviano F, Fossati V, Marchionni C, et al. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. BMC Dev Biol, 2007, 7: 11.

[18] RianchoJ A, Valero C, Zarrabeitia MT, et al. Genetic polymorphisms are associated with serum levels of sex hormone binding globulin in postmenopausa lwomen [J]. BMCMedGene, 2008, 9: 112.

[19] Soncini M, Vertua E, Gibelli L, et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. J Tissue Eng Regen Med, 2007, 1: 296-305.

[20] TanabeN, MaenoM, SuzukiN, et al. IL-1 alpha stimulates the formation of osteoclast like cells by increasing M-CSF and PGE2 production and decreasing OPG production byosteoblasts [J]. Life Sci, 2005, 6: 615-626.

[21] Samelson EJ, Christiansen BA, Demissie S, et al. Reliability of vertebral fracture assessment using multidetector CT lateral scout views: the Framingham Osteoporosis Study. Osteoporos Int, 2011, 22(4): 1123-31.

[22] Kim YM, Demissie S, Genant HK, et al. Identification of prevalent vertebral fractures using CT lateral scout views: a comparison of semi-automated quantitative vertebral morphometry and radiologist semi-quantitative grading. Osteoporos Int, 2012, 23(3): 1007-16.

[23] Muthusami S, Ramachandran I, Muthusamy B, et al. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats [J]. ClinChim Acta, 2005, 1-2: 81-86.

[24] Elaine D, Zoe C, Cyrus C. Diagnosis and epidemiology of osteoporosis. 2005 Lippincott Williams & Wilkins. Curr Opin Rheumatol, 2005, 17: 456-461.

[25] Bonnelye E, Aubin JE. Estrogen receptor-related receptor alpha: a mediator of estrogen response in bone [J]. JClin Endocrinol Metab, 2005, 5: 3115-3121.

[26] Laflamme N, Giroux S, Loredo-Osti JC, et al. A frequent regulatory variant of the estrogen-related receptor alphagene associated with BMD in French-Canadian premenopausa lwomen [J]. JBoneMiner Res, 2005, 6: 938-944.

(收稿日期: 2016-03-29; 修回日期: 2016-05-11)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net