

· 论 著 ·

阿司匹林对 I 型成骨不全小鼠脂肪来源间充质干细胞增殖和成骨分化的影响

刘硕 刘义 王建海 赵玉霞 李光*

天津医科大学基础医学院遗传学系,天津 300070

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 04-0431-08

摘要: **目的** 探讨阿司匹林对 I 型成骨不全小鼠脂肪来源间充质干细胞增殖和成骨分化能力的影响。**方法** 从 I 型成骨不全小鼠的脂肪组织中分离培养的脂肪间充质干细胞(ADSCs^{coll1a1+/-}),经流式细胞仪检测其表面间充质干细胞相关 Marker CD 29、CD 45 等的表达情况,并在成骨诱导 7 d 后进行 ALP 染色、成脂诱导 14 d 后进行油红 O 染色,验证 ADSCs^{coll1a1+/-}的成骨和成脂分化潜能;分别配制含 0、0.5、1、1.5、2、5、10 mmol/L 阿司匹林的培养基,MTS 检测不同浓度阿司匹林对 ADSCs^{coll1a1+/-}增殖的影响;将 ADSCs^{coll1a1+/-}分为对照组、单纯成骨诱导组和加入 1.5 mmol/L 阿司匹林的成骨诱导+阿司匹林组进行成骨诱导,比较 ALP 染色结果及 ALP 活性,qPCR 检测成骨相关基因及相关信号通路因子转录水平的变化。**结果** 分离培养的 ADSCs^{coll1a1+/-}高表达间充质干细胞相关 Marker CD 29 及 CD 45,低表达 CD 44,并具有成骨、成脂分化潜能;低、中浓度(0~2 mmol/L)的阿司匹林可促进 ADSCs^{coll1a1+/-}增殖,高浓度(5~10 mmol/L)时则抑制,浓度为 1.5 mmol/L 时促增殖效果最明显;与对照组和单纯成骨诱导组相比,成骨诱导+阿司匹林组的 ALP 表达明显增强,成骨相关基因 *coll1a1*、*bglap*、*runx2*、*osterix* 和 Wnt 信号通路中 β -catenin 以及 TGF- β 通路中 *bmp2* 的转录水平有显著上调。**结论** 阿司匹林能够促进 ADSCs^{coll1a1+/-}的增殖和成骨分化,可能是通过 Wnt 及 TGF- β 信号通路来促进成骨分化的。

关键词: 阿司匹林;成骨不全;脂肪间充质干细胞

Effects of aspirin on proliferation and osteogenic differentiation of adipose derived mesenchymal stem cells of type I Osteogenesis Imperfecta mice

LIU Shuo, LIU Yi, WANG Jianhai, ZHAO Yuxia, LI Guang*

Department of Genetics, School of basic Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

* Corresponding author: LI Guang, Email: lig@tmu.edu.cn

Abstract: **Objective** To detect the effect of aspirin on the proliferation and osteogenic differentiation of adipose derived mesenchymal stem cells of type I osteogenesis imperfecta mice. **Methods** The adipose derived mesenchymal stem cells (ADSCs^{coll1a1+/-}) were isolated and mesenchymal stem cell related marker CD 29, CD 45, et al. were identified by flow cytometry. To validate the multiple differentiation potential of ADSCs^{coll1a1+/-}, ALP staining were performed after 7 days of osteogenesis induction, and oil red O staining were performed after 14 days of adipogenic differentiation. The cell proliferation of ADSCs^{coll1a1+/-} were assayed by MTS assay after treatment with 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 5 and 10 mmol/L aspirin, separately. After osteogenic induction, alkaline phosphatase (ALP) staining and ALP activity were compared among groups, and changes of transcription level of osteogenic differentiation associated genes and signal pathway factors were determined by qPCR. **Results** ADSCs^{coll1a1+/-} have the potential of osteogenesis and adipogenic differentiation. Low and medium concentration (0~2 mmol/L) aspirin promoted ADSCs^{coll1a1+/-} proliferation, while high concentration (5~10 mmol/L) aspirin exhibited a repression effect. Compared with control group and osteogenesis group, the ALP level was obviously increased in the osteogenesis+Aspirin group. Moreover, significant up-regulation in transcription level were observed in osteoblastic differentiation associated genes (*coll1a1*, *bglap*, *runx2* and *osterix*) and β -catenin in Wnt signaling and *bmp2* in TGF- β pathway. **Conclusion** Aspirin promoted the proliferation of ADSCs^{coll1a1+/-} and enhanced osteogenic differentiation probably through Wnt and TGF- β pathway.

Key words: aspirin; osteogenesis imperfecta; adipose derived mesenchymal stem cells

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1001904);天津市科技支撑计划(16YFZCSY00900);国家自然科学基金青年项目(81501386)

* 通信作者: 李光, Email: lig@tmu.edu.cn

成骨不全症(osteogenesis imperfecta, OI)又称脆骨病,是一种罕见的遗传性骨骼发育障碍疾病。根据 Sillence 分型, OI 可分为 I ~ IV 四种类型, 其中 I 型成骨不全症状较轻, 最为常见^[1]。OI 的临床症状主要表现为骨质脆弱、反复多发性骨折、骨畸形、蓝巩膜等。绝大多数 OI 患者(85%~90%)编码 I 型胶原蛋白 α 链的 COL1A1 或 COL1A2 基因发生突变, 引起胶原合成不足或结构异常, 进而导致骨骼、皮肤、牙本质、巩膜等胶原丰富的结缔组织发生病变^[2]。另外, 受胶原分泌减少所造成的微环境影响, OI 患者的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)向成骨分化的能力降低, 倾向于分化为脂肪细胞^[3]。

阿司匹林(aspirin, Asp), 又名乙酰水杨酸, 是一种广泛使用的非甾体类抗炎药, 最初因解热、镇痛的功效被应用于临床。流行病学调查^[4]发现, 定期服用阿司匹林可提高绝经后妇女的骨密度。近年的研究^[5-6]表明, 阿司匹林对 MSCs 的成骨分化有促进作用。但是, 研究者^[7-9]大多采用来源于野生基因型动物的 MSCs, 而阿司匹林对成骨不全来源的 MSCs 的成骨分化是否有同样的促进作用, 至今未见报道。

本研究利用实验室建立的 COL1A1 缺失突变的 I 型成骨不全小鼠(oim), 从其脂肪组织中分离得到脂肪间充质干细胞(adipose derived mesenchymal stem cells, ADSCs^{col1a1+/-}), 探讨阿司匹林对 ADSCs^{col1a1+/-}增殖和成骨分化的影响及可能的作用机制, 为阿司匹林用于成骨不全的治疗奠定一定的理论及实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物:选取 6~8 周龄、基因型为 col1a1^{+/-}的 C57/BL6 小鼠(oim)。

1.1.2 主要试剂:组织基因组 DNA 提取试剂盒(美国 Biomiga 公司); α -MEM 培养基(美国 Hyclone 公司);胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);1×PBS 缓冲液(北京索莱宝公司);胎牛血清(以色列 Biological Industries 公司);阿司匹林(上海阿拉丁公司);地塞米松、抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠(美国 Sigma 公司);青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL(美国 Hyclone 公司);MTS 试剂(美国 Promega 公司);CD 29/44/45(美国 eBioscience 公司);细胞凋亡检测试剂盒(德国 Miltenyi 公司);碱性磷酸酶检测试剂盒、碱性磷酸酶染色试剂盒(上海碧云天公司);Trizol 试剂

(美国 Life Technologies 公司);反转录试剂盒(美国 Promega 公司);荧光定量 PCR 试剂盒(德国 Qiagen 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠基因型鉴定:新生雄性小鼠 2 周龄时剪尾尖提取 DNA, 以鼠尾 DNA 为模板进行 PCR 反应, 反应体系如表 1 所示。反应条件为:预变性 95 °C, 5 min;变性 95 °C, 30 s;退火 60 °C, 30 s;延伸 72 °C, 45 s(35 循环);延伸 72 °C, 5 min。

表 1 oim 小鼠基因型鉴定的反应体系

Table 1 Reaction system for genotypic identification of oim mice

反应体系(25 μ L)	
2×Rapid Taq Master Mix	12.5 μ L
双蒸水(ddH ₂ O)	9.5 μ L
上游引物	1 μ L
下游引物	1 μ L
DNA 模板	1 μ L

1.2.2 ADSCs^{col1a1+/-}的分离、培养:选取 6~8 周龄的 oim 雄性小鼠, 采用颈椎脱臼法处死, 并用 75%乙醇浸泡消毒。无菌剪取小鼠腋下、腹股沟、背部等处的脂肪组织浸泡于 α -MEM 培养基中, 将脂肪组织剪成细小碎块后转移至 50 mL 离心管, 加入 0.2% I 型胶原酶, 37 °C 摇床上消化 50 min 后加 1 mL 胎牛血清。将细胞悬液用 40 μ m 筛网过滤, 离心后弃去上清, 将细胞沉淀用含 15%胎牛血清的 α -MEM 培养基重悬, 以 1×10^6 /cm² 接种于 10 cm 细胞培养皿。于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 3 d 后换半液, 5~7 d 后细胞生长至 80%时传代。所有实验均使用传代培养至第 3 代的 ADSCs^{col1a1+/-}。

1.2.3 ADSCs^{col1a1+/-}的鉴定:流式细胞荧光分选技术(FACS)检测其表面间充质干细胞相关 Marker, 包括 CD 29、CD 44 和 CD 45; 将 ADSCs^{col1a1+/-}以 1×10^5 /孔接种到 24 孔板, 分别用成骨和成脂诱导培养基诱导培养, 14 d 后成骨诱导组进行 ALP 染色, 成脂诱导组进行油红 O 染色。

1.2.4 MTS 增殖实验:将 ADSCs^{col1a1+/-}以 1×10^4 /孔接种到 96 孔板, 隔天换液, 对照组加入 150 μ L 含 DMSO 的 α -MEM 培养基, 实验组分别加入 150 μ L 含 0.5、1、1.5、2.5、10 mmol/L 阿司匹林的 α -MEM, 每 3 天换液, 培养 5 d 后每孔加入 20 μ L MTS, 37 °C 孵育 4 h, 用酶标仪在 490 nm 波长下测定吸光度。

1.2.5 细胞凋亡检测:将 ADSCs^{col1a1+/-}以 3×10^5 /孔接种到 6 孔板, 隔天换液, 对照组加入含 DMSO 的 α -MEM, 实验组加入含 1.5 mmol/L 阿司匹林的 α -

MEM。3 d 后收集细胞,根据试剂盒说明书操作,标记 Annexin V-FITC 及 PI 抗体,FACS 检测荧光强度。

1.2.6 ADSCs^{coll1a1+/-}的诱导分化:将 ADSCs^{coll1a1+/-}分为 3 组,对照组加入含 DMSO 的培养基,单纯成骨诱导组加入含 DMSO 的成骨诱导培养基,成骨诱导+阿司匹林组加入含 1.5 mmol/L 阿司匹林的成骨诱导培养基,每 3 天更换一次培养液。成骨诱导培养基的制备见表 2。

表 2 成骨诱导培养基的配制
Table 2 Preparation of induction medium

试剂	溶剂	储存液浓度	100 mL 培养基加量	终浓度
地塞米松 (Dex)	DMSO	1×10^{-4} mol/L	100 μ L	1×10^{-7} mol/L
抗坏血酸 (Ve)	PBS	5×10^3 mg/L	2 mL	100 mg/L
β -甘油磷酸钠	PBS	2×10^{-4} mol/L	5 mL	1×10^{-5} mol/L
阿司匹林	DMSO	500 mmol/L	300 μ L	1.5 mmol/L

1.2.7 碱性磷酸酶 (ALP) 染色及活性检测:将 ADSCs^{coll1a1+/-}以 1×10^5 /孔接种到 24 孔板,分组培养,7 d 后根据试剂盒说明书进行 ALP 染色;将 ADSCs^{coll1a1+/-}以 3×10^4 /孔接种到 12 孔板,分组培养,7 d 后收集上清,将上清进行 5 倍稀释后按说明书步骤检测 ALP 活性。

1.2.8 成骨相关基因转录水平检测:将 ADSCs^{coll1a1+/-}以 3×10^5 /孔接种到 6 孔板,分组培养,14 d 后收集细胞,Trizol 法提取总 RNA,反转录成 cDNA,采用实时荧光定量 PCR 反应 (qPCR) 测定成骨相关基因的转录水平,引物序列见表 3。实验以 gapdh 作为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。

表 3 qPCR 检测目的基因引物序列

Table 3 Primers of target genes detected by qPCR

基因	引物序列 (5'→3')	产物大小
gapdh	F CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	153 bp
	R ATGCCAGTGAAGCTTCCCGTTCAG	
coll1a1	F CCTCAGGGTATTGCTGGACAAC	115 bp
	R CAGAAGGACCTTGTTCGCCAGG	
bglap	F TCTGACAAACCTTCATGTCC	198 bp
	R AAATAGTGATACCGTAGATGCG	
runx2	F CCTGAAGTCTGCACCAAGTCCT	125 bp
	R TCATCTGGCTCAGATAGGAGGG	
osterix	F GGCTTTTCTGCGCAAGAGGTT	139 bp
	R CGCTGATGTTTGCTCAAGTGCTC	
β -catenin	F GTTCGCCTTCATTATGGACTGCC	146 bp
	R ATAGCACCTGTTCGCCGAAAG	
bmp2	F AACACCGTGGCAGCTTCATC	143 bp
	R CGGAAGATCTGGAGTTCTGCAG	

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较用

ANOVA 检验,两组间比较用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 I 型成骨不全小鼠的基因型鉴定

以鼠尾 DNA 为模板的 PCR 产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳后的结果 (图 1) 显示, coll1a1 部分敲除小鼠 (oim) 的 PCR 扩增产物为 533 bp;野生型小鼠 (WT) 的 PCR 扩增产物为 1 623 bp。

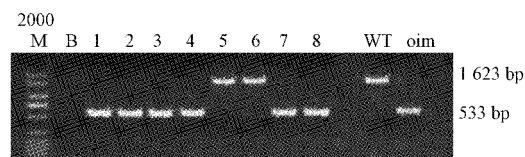


图 1 PCR 鉴定 oim 小鼠基因型

2 000 M; 2 000 bp DNA Ladder Marker; B: 空白对照; WT: WT 对照; oim: oim 对照。

Fig.1 Identification of genotypes of oim by PCR

2 000 M; 2 000 bp DNA Ladder Marker; B: Blank; WT: WT control; oim: oim control.

2.2 ADSCs^{coll1a1+/-}的培养及鉴定

ADSCs^{coll1a1+/-}的细胞形态如图 2 A 所示,原代培养 (P0) 中,第 3 天换液时有大量圆形悬浮细胞,4~5 d 贴壁细胞增多,可见散在集落式分布,5~7 d 细胞呈梭形或不规则形,细胞体积增大,相邻集落融合,铺满培养皿底 80% 以上即可进行传代。传代后细胞 (图 2 A, P1) 呈长梭形,后期呈漩涡式生长,增殖较快,3 d 左右可传代 1 次。流式鉴定结果 (图 2 B) 显示,培养至第 3 代的 ADSCs^{coll1a1+/-} (图 2 A, P3) 高表达间充质干细胞相关 Marker CD 29 和 CD 44,不表达白细胞 Marker CD 45。经成骨、成脂诱导培养基分别诱导后,ALP 染色和油红 O 染色结果 (图 2 C) 显示成骨、成脂诱导成功,证明分离得到的 ADSCs^{coll1a1+/-}具有多向分化潜能,为典型的间充质干细胞。

2.3 阿司匹林对 ADSCs^{coll1a1+/-}增殖及凋亡的影响

将 ADSCs^{coll1a1+/-}用含有不同浓度阿司匹林的完全培养基培养 5 d,MTS 增殖实验结果 (图 3 A) 表明,阿司匹林在低、中浓度 (0~2 mmol/L) 时可促进 ADSCs^{coll1a1+/-}增殖,高浓度 (5~10 mmol/L) 时则抑制增殖,且在 1.5 mmol/L 时促进增殖的效果最佳 ($*** P < 0.001$; $* P < 0.05$),因此,后续实验均选择 1.5 mmol/L 的浓度对细胞进行处理。流式分析阿司匹林处理 5 d 的 ADSCs^{coll1a1+/-}的凋亡情况,与未处

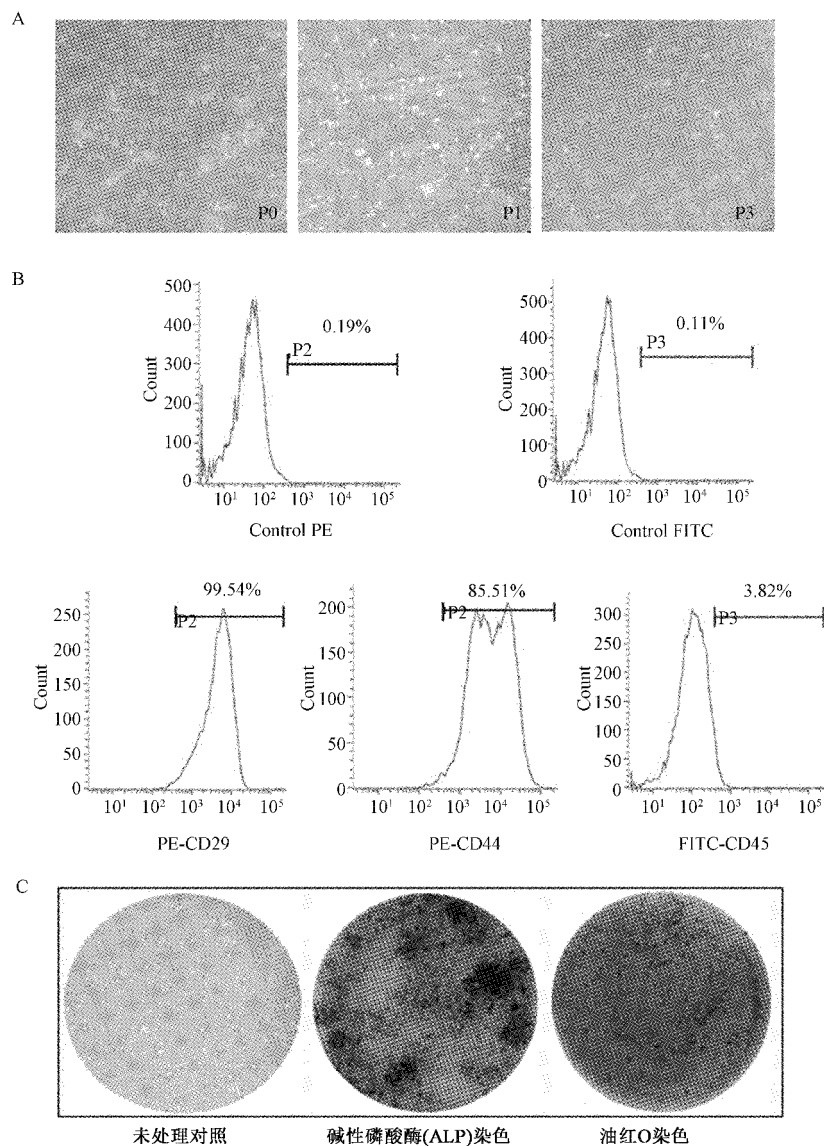


图2 ADSCs^{coll1a1}^{+/-}的培养及鉴定

A: 原代、第1代和第3代ADSCs^{coll1a1}^{+/-}的培养观察(10×); B: ADSCs^{coll1a1}^{+/-}的流式鉴定; C: ADSCs^{coll1a1}^{+/-}的成骨、成脂分化潜能鉴定。

Fig.2 Culture and identification of ADSCs^{coll1a1}^{+/-}

A: ADSCs^{coll1a1}^{+/-} culture of P0, P1 and P3; B: FACS identification of ADSCs^{coll1a1}^{+/-}; C: Osteogenesis and adipogenic differentiation identification of ADSCs^{coll1a1}^{+/-}.

理的对照组相比,阿司匹林组的凋亡细胞所占比例明显减少(图3B, $P < 0.05$),显示阿司匹林具有抑制ADSCs^{coll1a1}^{+/-}凋亡的作用。

2.4 阿司匹林对ADSCs^{coll1a1}^{+/-}成骨分化的影响

将ADSCs^{coll1a1}^{+/-}分组进行成骨诱导,7 d后ALP染色及活性测定结果(图4A)显示,与对照组或单纯成骨诱导组相比,成骨诱导+阿司匹林组的ALP染色深、活性显著升高($P < 0.001$)。同时,利用qPCR对成骨相关因子的表达量进行分析,结果表

明与单纯成骨诱导组相比,阿司匹林处理组的I型胶原蛋白和骨钙蛋白的编码基因coll1a1和bglap以及成骨相关转录因子runx2和osterix的mRNA表达量均有明显上调(图4B, $* P < 0.05$; $** P < 0.01$)。以上结果表明,阿司匹林有促进ADSCs^{coll1a1}^{+/-}向成骨方向分化的作用。

2.5 阿司匹林促进ADSCs^{coll1a1}^{+/-}成骨分化的机制

Wnt信号通路和TGF- β 信号通路是两个经典的成骨相关信号通路。qPCR检测ADSCs^{coll1a1}^{+/-}成

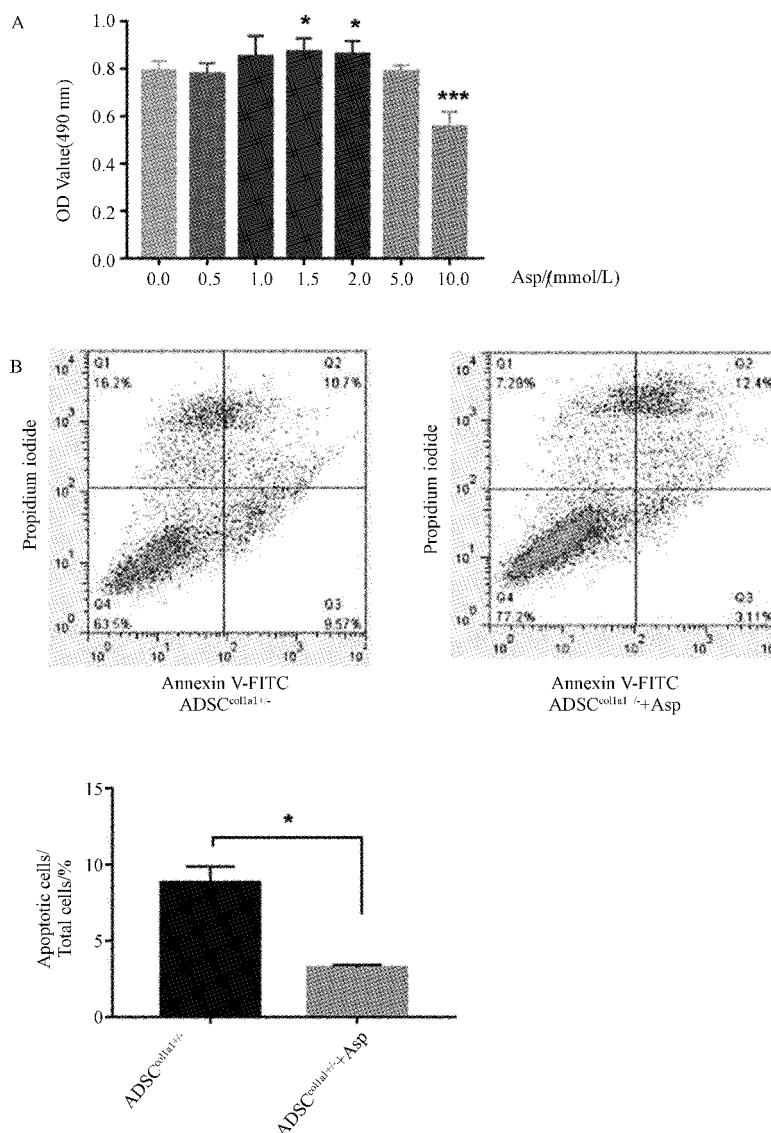


图3 阿司匹林对 ADSCs^{coll1+/-}增殖及凋亡的影响

A:不同浓度阿司匹林处理后 MTS 增殖吸光度检测柱状图(*** $P<0.001$; * $P<0.05$); B:1.5 mmol/L 阿司匹林处理 5 d 后流式细胞仪检测凋亡细胞所占比例(* $P<0.05$)。

Fig.3 Effects of aspirin on the proliferation and apoptosis of ADSCs^{coll1+/-}

A:MTS assay post different concentrations of aspirin treatment (*** $P<0.001$; * $P<0.05$); B:Percentage of apoptotic cells detected by FACS after 5 days of 1.5 mmol/L aspirin treatment(* $P<0.05$).

骨诱导 7 d 后 Wnt 通路中关键因子 β -catenin 以及 TGF- β 通路中 bmp2 的 mRNA 表达量,结果显示这两个因子在成骨诱导+阿司匹林组中的表达显著高于单纯成骨诱导组(图 5 A、5B, * $P<0.05$; ** $P<0.01$)。说明阿司匹林可能通过激活 Wnt/ β -catenin 通路和 BMP2 介导的 TGF- β 通路来促进 ADSCs^{coll1+/-} 向成骨方向分化,但具体机制仍有待于深入研究。

3 讨论

目前,临床上对 OI 的治疗以外科手术为主,双膦酸盐、生长激素等药物为辅,但这些治疗无法从根本上改变患者的胶原合成缺陷。为此,研究者们致力于探讨基因治疗、干细胞治疗等前景广阔的治疗方法^[10-11]。OI 患者的干细胞在治疗过程中应用的多为骨髓 MSCs,但骨髓 MSCs 只占骨髓单核细胞的 0.01%~0.1%,自骨髓中分离获得的细胞数量有限,

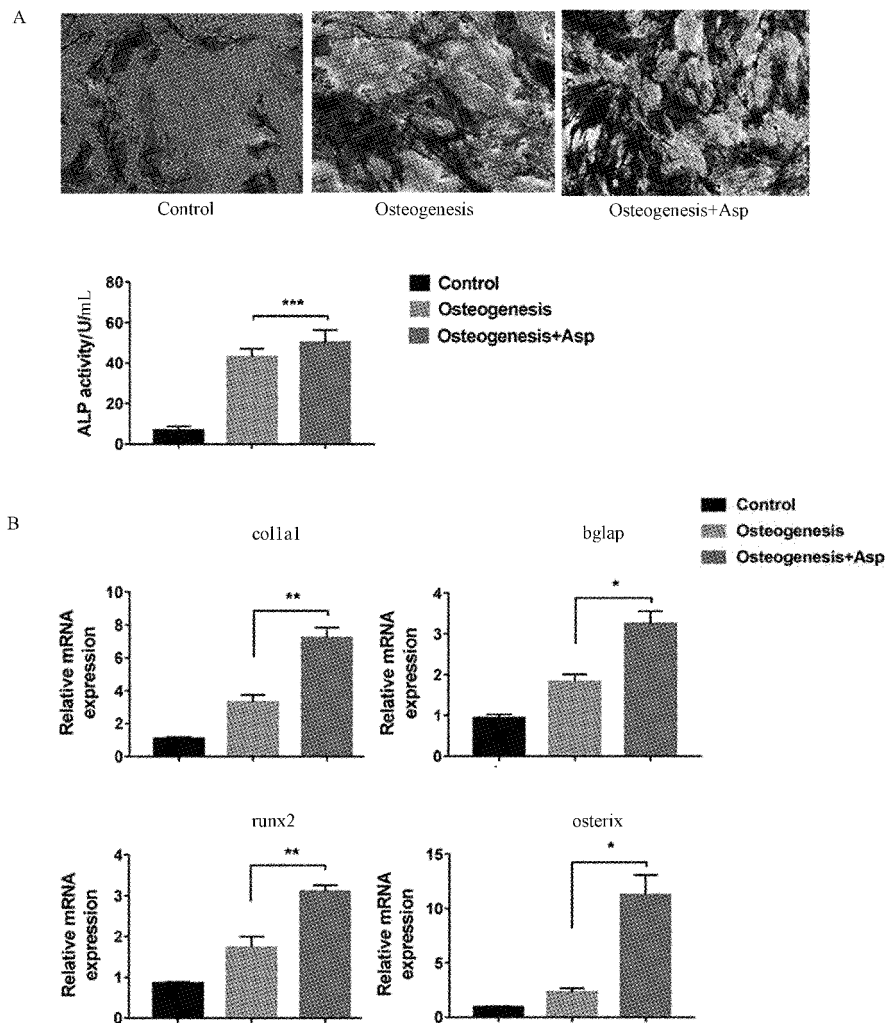


图 4 阿司匹林对 ADSCs^{coll1+/-} 成骨分化的影响

A: ADSCs^{coll1+/-} 分组成骨诱导后的 ALP 染色鉴定 (10×) 和 ALP 活性检测 (*** $P < 0.001$); B: qPCR 检测 ADSCs^{coll1+/-} 分组成骨诱导后成骨相关基因的转录水平 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)。

Fig.4 Effect of aspirin on osteogenic differentiation of ADSCs^{coll1+/-}

A: ALP staining and ALP activity detection of ADSCs^{coll1+/-} after osteogenic induction (*** $P < 0.001$); B: Transcription level of osteoblast-associated genes were detected by qPCR after osteogenic induction (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

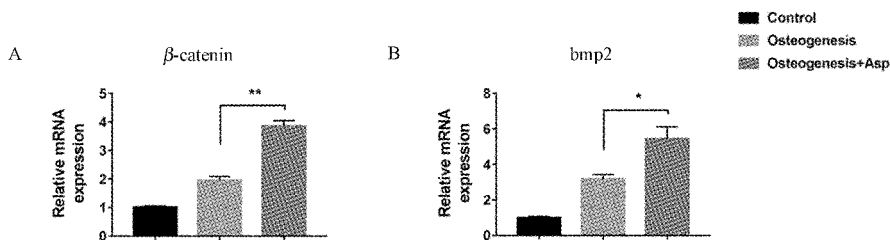


图 5 阿司匹林对 ADSCs^{coll1+/-} 中 β -catenin 和 bmp2 转录水平的影响

Fig.5 Effect of aspirin on transcriptional expression of β -catenin and bmp2 in ADSCs^{coll1+/-}

提取过程还会对人体骨骼造成伤害。相比之下, ADSCs 具有与骨髓 MSCs 相似的分化潜能与低免疫原性,而且来源广泛,只需少量脂肪组织即可获得大

量的干细胞,对人体损伤也较小,适宜自体或异体移植^[12]。研究^[13-14]发现, OI 患者及小鼠来源的 MSCs 成骨分化能力减弱,成脂分化能力增强,采用药物促

进其成骨分化,可对OI的治疗产生积极影响。因此,寻找能够促进MSCs成骨分化又安全有效的药物意义重大,本实验首次证实了阿司匹林对oim小鼠来源ADSCs的成骨分化具有促进作用。

近年来,阿司匹林在骨代谢和MSCs成骨分化方面的作用不断被发现。Carbone等^[15]的流行病学统计表明,服用阿司匹林的患者骨密度有显著提高。Cao等^[8]证明阿司匹林在体外能促进骨髓MSCs的增殖及成骨分化,并且可促进MSCs在迷你猪骨缺损处的骨生成作用;Liu等^[9]的研究揭示阿司匹林作用于人脱落乳牙干细胞后可促进其成骨分化;Abd等^[7]发现阿司匹林处理牙周膜干细胞后,其增殖能力有所提高且成骨分化增强。这些研究证实,阿司匹林具有促进MSCs成骨分化和加速骨组织修复的作用。

本实验以oim小鼠来源的ADSCs^{coll1a1+/-}为研究对象,发现低、中浓度(0~2 mmol/L)的阿司匹林可促进细胞增殖。另外,阿司匹林处理5 d后凋亡细胞所占比例明显下降,这可能是因为阿司匹林对肿瘤坏死因子(TNF α)有抑制作用^[16],从而抑制了ADSCs^{coll1a1+/-}的凋亡。ALP是成骨早期表达的标志性分子之一,ALP染色和活性检测均表明,阿司匹林可增加ADSCs^{coll1a1+/-}的ALP表达量。qPCR结果显示,成骨诱导+阿司匹林组的coll1a1、bglap等成骨相关基因的表达水平有明显上调。笔者的结果首次证明,阿司匹林对oim小鼠来源的ADSCs具有促进成骨分化的作用。

作为一种非选择性的环氧合酶(cyclooxygenase, COX)抑制剂,阿司匹林与多种生物信号途径相关^[18-20]。Liu等^[9]的研究显示,阿司匹林是通过TERT/Wnt/ β -catenin通路促进脱落乳牙干细胞的成骨分化。MSCs的成骨分化受到多种信号途径的调控,除Wnt/ β -catenin通路外,影响较大的还有TGF- β /BMPs信号通路^[21-24]。笔者的qPCR结果表明,Wnt通路中的 β -catenin和TGF- β 通路中bmp2基因转录水平均有明显上调。因此阿司匹林可能通过Wnt/ β -catenin以及TGF- β 这两个经典的成骨相关信号通路影响ADSCs^{coll1a1+/-}的成骨分化,但具体的机制还需要进一步研究^[25-28]。

综上,本研究首次发现阿司匹林可促进I型成骨不全小鼠ADSCs的成骨分化,作用的途径可能是Wnt/ β -catenin和TGF- β 信号通路,这为阿司匹林以及ADSCs应用于成骨不全的治疗奠定了一定的理论和实验基础。

【参 考 文 献】

- [1] Wang J, Ren X, Bai X, et al. Identification of gene mutation in patients with osteogenesis imperfect using high resolution melting analysis [J]. Sci Rep, 2015, 5: 13468.
- [2] Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, et al. New perspectives on osteogenesis imperfect [J]. Nature Rev Endocrinol, 2011, 7 (9): 540-557.
- [3] Marini JC, Forlino A, Bächinger HP, et al. Osteogenesis imperfecta [J]. Nature Rev Disease Primers, 2017, 3: 17052.
- [4] Kok-Yong Chin. A Review on the Relationship between Aspirin and Bone Health [J]. J Osteoporos, 2017, 2017: 3710959.
- [5] Yuan M, Zhan Y, Hu W, et al. Aspirin promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells [J]. Int J Mol Med, 2018, 42(4): 1967-1976.
- [6] Zhang J, Ma S, Liu Z, et al. Guided bone regeneration with asymmetric collagen-chitosan membranes containing aspirin-loaded chitosan nanoparticles [J]. Int J Nanomed, 2017(12): 8855-8866.
- [7] Abd RF, Mohd AJ, Abdullah M, et al. Aspirin enhances osteogenic potential of periodontal ligament stem cells (PDLSCs) and modulates the expression profile of growth factor-associated genes in PDLSCs [J]. J Periodontol, 2016, 87(7): 837-847.
- [8] Cao Y, Xiong J, Liu Y, et al. Aspirin promotes bone marrow mesenchymal stem cell-based calvarial bone regeneration in mini swine [J]. Stem Cell Res Therapy, 2015, 6: 210.
- [9] Liu Y, Chen C, Liu S, et al. Acetylsalicylic acid treatment improves differentiation and immunomodulation of SHED [J]. J Dent Res, 2015, 94(1): 209-218.
- [10] 汪子涵, 刘义, 鞠明艳, 等. 间充质干细胞治疗成骨不全: 是直接分化为功能细胞还是旁分泌作用 [J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(33): 5373-5378.
- [11] Jones GN, Moschidou D, Lay K, et al. Upregulating CXCR4 in human fetal mesenchymal stem cells enhances engraftment and bone mechanics in a mouse model of osteogenesis imperfecta [J]. Stem Cells Transl Med, 2012, 1(1): 70-78.
- [12] 赵刚, 刘微微, 高伟玮, 等. 不同组织来源间充质干细胞体外成骨分化能力的比较研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(5): 561-566.
- [13] Jacobsen CM, Schwartz MA, Roberts HJ, et al. Enhanced Wnt signaling improves bone mass and strength, but not brittleness, in the Coll1a1 (+/mov13) mouse model of type I Osteogenesis Imperfecta [J]. Bone, 2016, 90: 127-132.
- [14] Palomo T, Vilaca T, Lazaretti CM, et al. Osteogenesis imperfecta: diagnosis and treatment [J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes, 2017, 24(6): 381-388.
- [15] Carbone LD, Tylavsky FA, Cauley JA. Association between bone mineral density and the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and aspirin: impact of cyclooxygenase selectivity [J]. J Bone Miner Res, 2003, 18(10): 1795-1802.
- [16] Liu Y, Wang L, Kikuri T, et al. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocyte via IFN

- γ and $\text{TNF-}\alpha$ [J]. *Nat Med*, 2012, 17(12): 1594-1601.
- [17] 陈犹白, 陈聪慧, 韩岩, 等. 脂肪干细胞成骨分化的研究进展 [J]. *中华损伤与修复杂志(电子版)*, 2016, 11(2): 126-134.
- [18] Agas L, Marchetti M, Capitani. The dual face of parathyroid hormone and prostaglandins in the osteoimmune system [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, 305(10): E1185-E1194.
- [19] Raisz LG. Potential Impact of Selective Cyclooxygenase-2 inhibitors on bone metabolism in health and disease [J]. *Am J Med*, 2001, 110(3): 43-45.
- [20] Zhou Y, Boudreau DM, Freedman AN. Trends in the use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the general U. S. population [J]. *Pharmacoepidemiol Drug Safety*, 2014, 23(1): 43-50.
- [21] Chen Q, Shou P, Zheng C, et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts [J]? *Cell Death Different*, 2016, 23(7): 1128-1139.
- [22] He G, Shi Y, Lim J, et al. Differential involvement of Wnt signaling in Bmp regulation of cancellous versus periosteal bone growth [J]. *Bone Res*, 2017, 5: 17016.
- [23] Strini T, Tilburg J, Westerhoff H, et al. Identification of Three Early Phases of Cell-Fate Determination during Osteogenic and Adipogenic Differentiation by Transcription Factor Dynamics [J]. *Stem Cell Rep*, 2017, 8(4): 947-960.
- [24] Xu X, Zheng L, Yuan Q, et al. Transforming growth factor-beta in stem cells and tissue homeostasis [J]. *Bone Res*, 2018, 6: 2.
- [25] 熊燕琴, 周筠, 雷涛. 骨代谢信号通路的研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(2): 200-204.
- [26] Liu H, Li W, Liu Y, et al. Co-administration of aspirin and allogeneic adipose-derived stromal cells attenuates bone loss in ovariectomized rats through the anti-inflammatory and chemotactic abilities of aspirin [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 200.
- [27] Su YF, Yang SH, Lee YH, et al. Aspirin-induced inhibition of adipogenesis was p53-dependent and associated with inactivation of pentose phosphate pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014 (738): 101-110.
- [28] Zhan Y, He Z, Liu X, et al. Aspirin-induced attenuation of adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells is accompanied by the disturbed epigenetic modification [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 98: 29-42.
- (收稿日期: 2018-09-26; 修回日期: 2018-11-29)

(上接第 424 页)

- [3] Cho BC, Park JW, Baik BS, et al. Clinical application of injectable calcium sulfate on early bony consolidation in distraction osteogenesis for the treatment of craniofacial microsomia [J]. *J Craniofac Surg*, 2002, 13(3): 465-475.
- [4] Kelly CM, Wilkins RM. Treatment of benign bone lesions with an injectable calcium sulfate-based bone graft substitute [J]. *Orthopedics*, 2004, 27(Suppl 1): s131-s135.
- [5] Barrere F, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics [J]. *Int J Nanomed*, 2006, 1(3): 317-332.
- [6] Walsh WR, Morberg P, Yu Y, et al. Response of a calcium sulfate bone graft substitute in a confined cancellous defect [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2003, 406: 228-236.
- [7] Jia L, Peng Z, Yu L, et al. Repair of bone defects in rat radii with a composite of allogeneic adipose-derived stem cells and heterogeneous deproteinized bone [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 79.
- [8] Gamell C, Osses N, Bartrons R, et al. BMP2 induction of actin cytoskeleton reorganization and cell migration requires PI3-kinase and Cdc42 activity [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121 (Pt 23): 3960-3970.
- [9] Ahmed M, Basheer HA, Ayuso JM, et al. Agarose spot as a comparative method for in situ analysis of simultaneous chemotactic responses to multiple chemokines [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1075.
- [10] Gamell C, Susperregui AG, Bernard O, et al. The p38/MK2/Hsp25 pathway is required for BMP-2-induced cell migration [J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16477.
- [11] 陈伟健, 晋大祥, 谢炜星, 等. Runx2 基因参与骨代谢相关通路的研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(4): 556-560.
- [12] 陈伟健, 谢炜星, 温龙飞, 等. Smad 与骨质疏松症 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(8): 1100-1104.
- [13] Ulsamer A, Ortuño MJ, Ruizet S, et al. BMP-2 induces Osterix expression through up-regulation of Dlx5 and its phosphorylation by p38 [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(7): 3816-3826.
- [14] Olszak IT, Poznansky MC, Evans RH, et al. Extracellular calcium elicits a chemokinetic response from monocytes in vitro and in vivo [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(9): 1299-1305.
- [15] Gonzalez-Vazquez A, Planell JA, Engel E. Extracellular calcium and CaSR drive osteoinduction in mesenchymal stromal cells [J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(6): 2824-2833.
- (收稿日期: 2018-05-01; 修回日期: 2018-07-04)