

· 论 著 ·

## 2型糖尿病性骨质疏松大鼠 ADSCs 成骨能力的研究

谭伟源\* 陈军平 宋若愚 陈诗迪

遵义医科大学第五附属(珠海)医院骨二科,广东 珠海 519100

中图分类号: R332;R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 09-1201-06

**摘要:** **目的** 探讨2型糖尿病性骨质疏松(DOP)大鼠自身脂肪干细胞(ADSCs)的体外成骨分化能力。**方法** 将60只SD大鼠分为对照组、骨质疏松组(OP组)及2型糖尿病性骨质疏松组(DOP组),每组20只。DOP组大鼠喂食高脂高糖饲料后于左下腹部经腹腔注射STZ先建立2型糖尿病大鼠模型,再行卵巢切除术建立2型糖尿病性骨质疏松模型;OP组大鼠行卵巢切除术建立骨质疏松大鼠模型,对照组仅切除卵巢周围脂肪。对照组随机选取10只大鼠,DOP组及OP组从建模成功的大鼠中各随机选取10只作研究。从各研究大鼠腹股沟区脂肪组织中分离脂肪干细胞,培养并传代,取第3代细胞作成骨结节染色及定量分析,PCR检测成骨基因RUNX2、OCN、OPN、ALP mRNA的表达。**结果** 造模后DOP组大鼠BMD明显低于对照组及OP组( $P<0.05$ );三组大鼠ADSCs细胞形态学及增殖情况无显著性差异;显微镜下观察见DOP组与OP组ADSCs的钙化结节量较对照组少,DOP组钙化结节最少,并且缺少大片状结节,染色较浅;成骨定量分析结果可得DOP组ADSCs的OD值低于对照组及OP组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );RT-PCR检测成骨基因的表达,DOP组与OP组RUNX2、OCN、OPN、ALP mRNA的表达量均低于对照组( $P$ 均 $<0.05$ ),DOP组与OP组相比较,DOP组RUNX2与ALP mRNA的表达量明显低于OP组( $P<0.05$ ),而OCN与OPN mRNA的表达量两组无明显差异( $P>0.05$ )。**结论** DOP大鼠ADSCs成骨分化能力较弱,弱于单纯骨质疏松大鼠,原因可能与高血糖状态下其ADSCs中ALP和RUNX2的表达减少有关。

**关键词:** 糖尿病性骨质疏松;成骨分化;脂肪干细胞;大鼠

### Osteogenic ability of ADSCs in type 2 diabetic osteoporosis rats

TAN Weiyan\*, CHEN Junping, SONG Ruoyu, CHEN Shidi

The Fifth Affiliated (Zhuhai) Hospital of Zunyi Medical University, Zhuhai 519100, Guangdong, China

\* Corresponding author: TAN Weiyan, Email: wesleyuan@163.com

**Abstract:** **Objective** To investigate the osteogenic differentiation ability of adipose-derived stem cells (ADSCs) in type 2 diabetic osteoporosis rats in vitro. **Methods** Sixty SD rats were divided into three groups, including control group, osteoporosis group (OP group), and type 2 diabetic osteoporosis group (DOP group), with twenty rats in each group. After feeding with high-fat and high-sugar diet, the rats in DOP group were injected with STZ into the lower left abdomen to establish the type 2 diabetic model. Ovariectomy was then performed to establish the type 2 diabetic osteoporosis model. Periovarian fat was removed only in rats of the control group. Ten rats were randomly selected from the control group and ten rats from DOP group and OP group, respectively, were randomly selected from the successfully modeled rats. ADSCs were isolated from the inguinal adipose tissue of the rats, and cultured and passaged. The 3rd generation cells were stained for osteoblasts and quantitatively analyzed. The expression of osteogenic genes RUNX2, OCN, OPN, and ALP was detected using PCR. **Results** BMD in DOP group was significantly lower than that in both control and OP group ( $P<0.05$ ). There was no significant difference in morphology and proliferation of ADSCs among the three groups. Microscopic observation showed that the number of calcified nodules in DOP group and OP group was less than that in control group. The number of calcified nodules was least in DOP group. The large calcified nodules were absent and the staining was light. Quantitative analysis of osteogenesis showed that the OD value of ADSCs in DOP group was lower than that in control group and OP group. The expression of osteogenic genes RUNX2, OCN, OPN, and ALP in DOP group and OP group was lower than that in control group ( $P<0.05$ ). The expression of RUNX2 and ALP in DOP group was lower than in OP group ( $P<0.05$ ), while the expression of OCN and OPN was not significantly different between the two groups ( $P>0.05$ ).

基金项目: 珠海市医学科研课题立项(20181117A010070)

\* 通信作者: 谭伟源, Email: wesleyuan@163.com

**Conclusion** The osteogenic differentiation ability of ADSCs in DOP rats is weaker than that in OP rats, which may be related to the decrease of ALP and RUNX2 expression in ADSCs under hyperglycemia.

**Key words:** diabetic osteoporosis; osteogenic differentiation; adipose-derived stem cells; rat

糖尿病性骨质疏松(diabetic osteoporosis, DOP)是继发性骨质疏松症的一种,亦是糖尿病严重的骨骼并发症<sup>[1]</sup>,是因糖尿病所并发的骨量减少、骨组织微结构异常、骨脆性增加并且易发生骨折的一种全身性、代谢性骨病<sup>[2]</sup>。有研究指出,糖尿病患者中合并有骨质疏松的比例可达50%以上<sup>[3]</sup>。DOP的发病率呈逐年上升趋势,其高致残率大大降低患者的生活质量,同时也带来极大的社会经济负担<sup>[4]</sup>。目前DOP的治疗主要以控制血糖及抗骨质疏松治疗为主,寻求更有效的、专门针对DOP的治疗方法是目前DOP研究的重点<sup>[5]</sup>。干细胞治疗技术的发展为DOP的治疗带来曙光。脂肪干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, ADSCs)是一种获取容易、来源丰富的干细胞,已被用于多种疾病的治疗<sup>[6]</sup>,有学者指出自体ADSCs移植可用于骨质疏松的治疗,并得到良好的疗效<sup>[7]</sup>。但DOP个体自身的ADSCs成骨能力如何,能否应用于DOP的治疗,目前相关的研究较欠缺。于2018年4月至2019年1月,本研究观察了2型糖尿病性骨质疏松大鼠ADSCs的体外成骨能力,旨在探讨DOP患者应用自体ADSCs治疗DOP的可能性,为未来本方向医学领域的发展提供借鉴,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

动物:健康12周龄SD大鼠60只,雌性,体重210~230 g,由广东省实验动物中心提供,许可证号:SCXK(粤)2013-0002。各大鼠分笼饲养,自由饮食。主要实验试剂:DMEM高糖液体培养基、胎牛血清、青-链霉素双抗(广州玺美生物科技有限公司);Trizol(美国Invitrogen公司);链脲霉素(streptozocin, STZ)(Sigma公司);RT-PCR试剂盒(TAKARA公司)。主要实验器材:Hema9600基因扩增仪(珠海黑马医学仪器有限公司);微量分光光度计K2800(北京凯奥科技有限公司);双能X线骨密度仪OSTEOCORE(法国MEDILINK)。

### 1.2 DOP及OP大鼠模型的建立

60只SD大鼠随机分为对照组、骨质疏松组(OP组)、2型糖尿病性骨质疏松组(DOP组)3组,每组20只。DOP组大鼠适应环境饲养1周后,给

予高糖高脂饲料喂养,连续喂养8周后,禁食12 h,于大鼠左下腹部经腹腔注射2% STZ 30 mg/kg,每两周注射1次,共两次。于最后一次注射STZ 72 h后于大鼠尾静脉取血,采用血糖检测仪测量空腹血糖值,血糖 $\geq 16.7$  mmol/L为2型糖尿病大鼠模型造模成功<sup>[8]</sup>。2型糖尿病大鼠造模成功后,各大鼠给予10%水合氯醛1.5 mL/kg,经腹腔注射麻醉,麻醉满意后,腹正中切开切除大鼠双侧卵巢。卵巢切除术后各大鼠每天肌注青霉素钠(5万U/d)预防感染,连续3 d。OP组大鼠同法切除双侧卵巢,对照组同法仅切除双侧卵巢周围脂肪。3组大鼠正常饲养3个月,使用双能X线骨密度仪测定各组大鼠腰4、5椎骨密度(bone mineral density, BMD),以BMD<对照组BMD均值的2.5个标准差确认OP组骨质疏松大鼠模型及DOP组2型DOP大鼠模型建立成功<sup>[9]</sup>。建模完成后,对照组随机选取10只大鼠, DOP组及OP组从建模成功的大鼠中各随机选取10只作研究。

### 1.3 大鼠脂肪干细胞的分离与传代

将3组各大鼠分别用10%水合氯醛经腹腔注射充分麻醉后,取仰卧位,剪除双侧腹股沟区鼠毛,消毒铺洞巾,每只大鼠切除腹股沟区脂肪组织约2 g,剔去脂肪组织中可见的血管及浅筋膜,予PBS液多次清洗后剪至糊状。用0.1% I型胶原酶消化后离心,弃上清液后加入完全培养基重悬,将细胞悬液置于T25培养瓶中接种,于细胞培养箱(37℃、5% CO<sub>2</sub>)中培养。2 d后首次换液,此后每3天换液。每天使用倒置显微镜观察各组大鼠ADSCs生长情况,当细胞汇合度达80%时,进行传代,取各组大鼠第3代ADSCs备用。应用CCK-8法检测3组大鼠第3代ADSCs增殖情况,酶标仪检测3组ADSCs 450 nm处吸光度,计算光密度(optical density, OD)值,连续检测10 h。以天数为横轴,OD值为纵轴绘制第3代ADSCs生长曲线。

### 1.4 各组大鼠ADSCs成骨能力测定

**1.4.1 ADSCs成骨结节染色及定量分析:**取各组大鼠第3代ADSCs接种于6孔板,密度为 $1 \times 10^5$ /孔,无菌载玻片覆盖。细胞培养至汇合度达80%时,加入成骨诱导液(高糖DMEM液体培养基+10%胎牛血清+1%青-链霉素双抗+1 mol/L地塞米松+50

mmol/L 抗坏血酸+10 mmol/L $\beta$ -甘油磷酸钠)置于细胞培养箱(37℃、5% CO<sub>2</sub>)中培养,每3天换液1次,在成骨诱导13 d后行茜素红染色,倒置显微镜下观察成骨钙结节并拍照。拍照后,使用氯化十六烷基吡啶析出成骨结节中与茜素红结合的钙离子,应用酶标仪检测3组ADSCs 620 nm处的OD值,以OD值作成骨定量分析。

**1.4.2 RT-PCR检测各组大鼠ADSCs成骨相关基因的表达:**取各组大鼠经成骨诱导后的第3代ADSCs,予PBS液冲洗3次后,加入至含Trizol液的离心管,经相分离、RNA沉淀洗涤及溶解提取ADSCs总RNA,检测纯度合格后反转录成cDNA,以ACTB作为内参,在荧光定量仪上使用实时PCR试剂盒进行PCR反应,检测各组ADSCs成骨相关基因mRNA的表达,包括:核心结合因子(runt-related transcription factor 2, RUNX2)、骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)。各基因引物由苏州泓迅生物科技有限公司设计及合成,各引物序列为: RUNX2上游引物: 5'-CGCCTCACAAACAACCACAG-3', RUNX2下游引物: 5'-AATGACTCGGTGCTCTCGG-3'; OCN上游引物: 5'-CAACCCCAATTGTGACGAGC-3', OCN下游引物: 5'-AACGGTGGTGCCATAGATGC-3'; OPN上游引物: 5'-AGACTGGCAGTGTTTGCTT-3', OPN下游引物: 5'-AGTGTTCCTGTAATGCGCC-3'; ALP上游引物: 5'-CGTTTTACGTTTGCTGGCT-3', ALP下游引物: 5'-ACCGTCCACCACCTTGTAAAC-3'; 内参基因ACTB上游引物: 5'-CCCTAAGGCCAACCGTGAAAA-3', 下游引物: 5'-GTACGACCAGGCATACAGG-3'。PCR反应条件为:95℃预变性3 min,95℃变性25 s,60℃退火35 s,共40个循环。应用2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>法计算各基因的表达量。

## 1.5 统计学处理

实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 17.0软

件作统计学分析,统计方法多组间比较采用方差分析,组间数据两两比较采用LSD-t检验, $P < 0.05$ ,为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DOP及OP大鼠模型建立情况

20只DOP组大鼠经腹腔注射2% STZ后共19只发生2型糖尿病,19只2型糖尿病大鼠行卵巢切除术后共有15只出现骨质疏松,共15只DOP大鼠建模成功,符合入组条件,从中随机选取10只建模成功的DOP大鼠作研究;20只OP组大鼠行卵巢切除术后共有12只出现骨质疏松,符合入组条件,从中随机选取10只建模成功的OP组大鼠作研究;对照组中随机选取10只大鼠入组作研究。3组大鼠在造模过程中均未出现死亡。

### 2.2 3组大鼠造模后骨密度情况

造模后DOP组大鼠与OP组大鼠BMD明显低于对照组( $P < 0.05$ ),并且DOP组大鼠BMD更明显低于OP组( $P < 0.05$ )(见表1)。

表1 三组大鼠造模后腰椎BMD( $\bar{x} \pm s$ , g/cm<sup>2</sup>)

Table 1 BMD of the lumbar spine in rats of three groups after model establishment ( $\bar{x} \pm s$ , g/cm<sup>2</sup>)

| 组别   | n  | BMD                 |
|------|----|---------------------|
| 对照组  | 10 | 0.325 $\pm$ 0.017   |
| OP组  | 10 | 0.193 $\pm$ 0.021*  |
| DOP组 | 10 | 0.157 $\pm$ 0.015*# |

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与OP组比较,# $P < 0.05$ 。

### 2.3 3组大鼠ADSCs的生物活性

显微镜下观察3组大鼠的ADSCs原代细胞生长情况,发现接种于培养瓶后12 h开始贴壁,约24 h全部贴壁。3组大鼠ADSCs生长状态良好,外观无明显差异,均呈现长梭型,边缘透明,胞内无深色颗粒和杂点,细胞外环境无漂浮深色颗粒及细胞碎片(见图1)。经消化、传代,绘制第3代ADSCs生长曲线,见3组ADSCs均于前两天缓慢增长,于第三天起增殖速度加快,4至6 d DOP组与OP组细胞

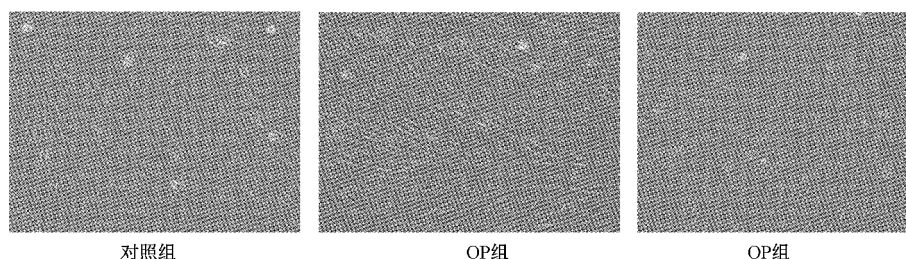


图1 大鼠原代ADSCs生长情况( $\times 100$ )

Fig.1 Growth of primary generation ADSCs in rats of three groups ( $\times 100$ )

增殖速度较对照组快,于6天后细胞增殖平缓,至第10天3组细胞均铺满培养瓶瓶底(见图2)。

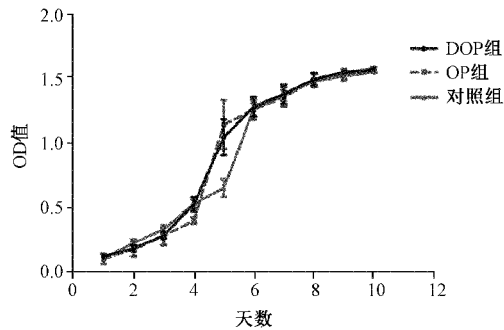


图2 3组大鼠第三代ADSCs生长曲线

Fig.2 Growth curves of the third generation ADSCs in rats of three groups

#### 2.4 3组大鼠ADSCs成骨结节检测

3组大鼠第3代ADSCs在成骨诱导13d后进

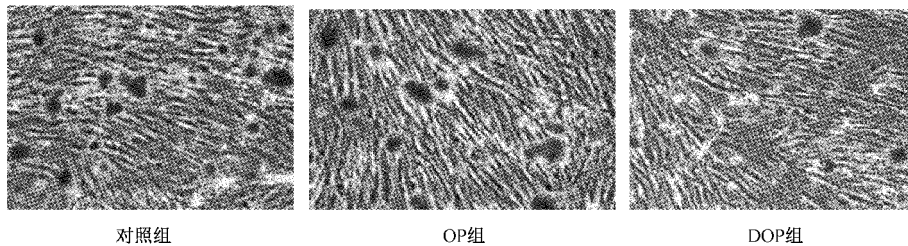


图3 三组大鼠第三代ADSCs成骨诱导后茜素红染色结果

Fig.3 Alizarin red staining after osteogenic induction of the third generation of ADSCs in rats of three groups

表2 成骨诱导后各组ADSCs成骨定量结果( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Quantitative results of ADSCs osteogenesis in each group after osteogenesis induction ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | n  | OD值(620 nm)   |
|------|----|---------------|
| 对照组  | 10 | 0.143±0.032   |
| OP组  | 10 | 0.097±0.015*  |
| DOP组 | 10 | 0.053±0.011*# |

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ;与OP组比较,# $P<0.05$ 。

### 3 讨论

随着2型糖尿病发病率的逐年增高,DOP在临床上也愈发常见<sup>[10]</sup>。DOP的发病机制目前仍未完

行茜素红染色,显微镜下可见DOP组与OP组大鼠的钙化结节量较对照组少,DOP组钙化结节最少,并且缺少大片状结节,染色较浅(见图3)。从成骨定量分析结果可见,DOP组与OP组的OD值均低于对照组( $P<0.05$ ),并且DOP组明显低于OP组( $P<0.05$ )(见表2)。

#### 2.5 RT-PCR检测三组ADSCs成骨相关基因的表达

于成骨诱导13d后,RT-PCR检测3组ADSCs成骨基因RUNX2、OCN、OPN、ALP mRNA的表达,DOP组与OP组四基因mRNA的表达量均低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );DOP组与OP组相比较,OCN与OPNmRNA的表达量无明显差异( $P>0.05$ ),而DOP组RUNX2与ALPmRNA的表达量明显低于OP组( $P<0.05$ )(见表3)。

全明确,目前考虑与糖尿病高血糖状态下出现骨代谢异常、成骨细胞活性减弱、破骨细胞活增强、血钙水平下降等方面有关<sup>[11]</sup>。本研究采用喂食高脂高糖饲料加腹腔注射STZ联合双侧卵巢切除术的方法成功建立2型DOP大鼠,从造模腰椎骨密度检测结果可得,DOP组大鼠BMD明显低于OP组,说明高血糖状态下出现骨质疏松骨量丢失会更严重,糖尿病性骨质疏松比单纯骨质疏松具有更大的危害性。进一步明确DOP的发病机制,寻找有效的防治DOP的方法刻不容缓。

目前,已有研究表明通过移植自体ADSCs对2

表3 成骨诱导后各组ADSCs成骨相关基因mRNA的表达( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Osteogenesis-related gene expression of ADSCs in each group after osteogenesis induction( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | n  | OCN          | ALP           | OPN          | RUNX2         |
|------|----|--------------|---------------|--------------|---------------|
| 对照组  | 10 | 1.58±0.125   | 1.253±0.157   | 1.334±0.205  | 1.226±0.234   |
| OP组  | 10 | 0.764±0.081* | 0.566±0.102*  | 0.551±0.121* | 0.586±0.103*  |
| DOP组 | 10 | 0.742±0.104* | 0.301±0.037*# | 0.529±0.142* | 0.263±0.048*# |

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ;与OP组比较,# $P<0.05$ 。

型糖尿病有一定治疗作用<sup>[12-13]</sup>,亦有学者通过实验得出经静脉移植 ADSCs 能减少单纯骨质疏松大鼠的骨量丢失<sup>[14]</sup>。但 DOP 患者同时存在糖尿病和骨质疏松症两种病理状态,其自身 ADSCs 成骨分化能力是否比单纯 OP 差,应用自体 ADSCs 干预 DOP 能否也能起到一定作用,目前相关的研究尚欠缺。本研究将 DOP 组大鼠 ADSCs 成骨分化情况与 OP 组、对照组作比较,探讨 2 型 DOP 大鼠 ADSCs 成骨分化的能力,从而为应用自体 ADSCs 移植治疗 2 型 DOP 打下基础。

从研究结果可得,从 DOP 组大鼠脂肪组织中可成功分离并传代 ADSCs,并且 DOP 组 ADSCs 细胞形态和增殖情况与 OP 组、对照组无明显差异,提示从 DOP 大鼠中可提取丰富的 ADSCs。但从成骨诱导后显微镜下观察结果及定量分析结果可得,DOP 组大鼠 ADSCs 的成骨分化能力要低于对照组,甚至低于单纯 OP 组。从 RT-PCR 检测 3 组 ADSCs 成骨基因表达的结果可得,DOP 组与 OP 组 RUNX2、OCN、OPN、ALP mRNA 的表达量均低于对照组,并且 DOP 组与 OP 组作比较,DOP 组 RUNX2 与 ALP mRNA 的表达量明显低于 OP 组,进一步体现了 DOP 组 ADSCs 的成骨分化能力要低于 OP 组,为 3 组中最弱。进一步分析 RT-PCR 结果可得,DOP 组与 OP 组 OCN、OPN mRNA 的表达量并无明显差异,可以推测两组 ADSCs 成骨能力的差异可能与 RUNX2、ALP 的表达水平密切相关。ALP 与 RUNX2 均是反映干细胞早期成骨能力的重要基因<sup>[15]</sup>。ALP 是细胞早期成骨的重要标志物,其表达量影响着骨代谢的发生发展<sup>[16]</sup>。RUNX2 则是影响干细胞成骨分化的特异转录因子,可促进细胞成骨分化及诱导软骨形成<sup>[17-18]</sup>。RUNX2 和 ALP 基因目前被认为对干细胞的成骨能力具有重大作用<sup>[19]</sup>,以二者为核心的信号通路直接控制骨组织的建立<sup>[20]</sup>。从 PCR 结果可以推测,DOP 组在高血糖状态下自身 ADSCs 中 RUNX2、ALP 基因会较 OP 组进一步降低,这可能是 DOP 组 ADSCs 成骨能力弱于 OP 组的直接原因,通过上调 ADSCs 中 RUNX2、ALP 的表达有望提高其成骨分化能力,从而为 DOP 患者自体 ADSCs 移植治疗带来希望。至于 2 型 DOP 大鼠体内存在何种机制能够加重 ALP 和 RUNX2 基因水平的急剧下调,这需要进一步研究探讨。

综上所述,2 型 DOP 大鼠 ADSCs 体外成骨分化能力较弱,弱于单纯骨质疏松大鼠,原因可能与高血糖状态下其 ADSCs 中 ALP 和 RUNX2 的表达进一

步减少有关。单纯移植自体 ADSCs 干预自身 DOP 可能疗效较差,提高其 ADSCs 成骨分化能力,未来有望实现应用自体 ADSCs 完成自身 DOP 的治疗。

## 【参考文献】

- [1] Wang T, Cai L, Wang Y, et al. The protective effects of silibinin in the treatment of streptozotocin-induced diabetic osteoporosis in rats[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89:681-688.
- [2] 李晓宇,冯正平.糖尿病性骨质疏松发病机制的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*,2014,20(5):580-583.
- [3] 卢广民,周生艳,徐刻.降钙素联合骨化三醇胶丸对糖尿病合并骨质疏松症的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*,2019,25(1):103-106.
- [4] Zheng ZG, Zhang X, Zhou YP, et al. Anhydroicaritin, a SREBPs inhibitor, inhibits RANKL-induced osteoclastic differentiation and improves diabetic osteoporosis in STZ-induced mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 809:156-162.
- [5] 孙军平,徐向阳,吕刚.糖尿病性骨质疏松症的治疗进展[J]. *医学综述*,2017,23(13):2634-2638.
- [6] Bin L, Gang L, Bo X, et al. Glucocorticoids-induced osteonecrosis of the femoral head: adipogenic differentiation and treatment progress[J]. *Chin J Tiss Eng Res*, 2014, 18(29):4730-4735.
- [7] Phetfong J, Sanvoranart T, Nartprayut K, et al. Osteoporosis: the current status of mesenchymal stem cell-based therapy[J]. *Cell Mol Biol Letters*, 2016, 21(1):12.
- [8] 张贤梅,孙勤国,江波,等.从泽伟.糖松康合剂对糖尿病性骨质疏松大鼠的治疗作用及其对 IGF-1 和 GLP-1 表达的影响[J]. *中国中医骨伤科杂志*,2018,26(09):5-8.
- [9] 张燕,杨秋萍,赵燕,等.2 型糖尿病大鼠骨质疏松模型的建立[J]. *中国组织工程研究*,2016,20(40):6041-6047.
- [10] 何文涛,余学锋.糖尿病性骨质疏松发病情况及机制新认识[J]. *诊断学理论与实践*,2018,17(1):5-10.
- [11] Zhen DH, Liu LJ, Guan CH, et al. High prevalence of vitamin D deficiency among middle-aged and elderly individuals in Northwestern China: its relationship to osteoporosis and lifestyle factors[J]. *Bone*, 2015, 71(3):1-6.
- [12] 张新,周玉红,白云.自体脂肪干细胞移植治疗 2 型糖尿病的安全性及有效性[J]. *中国医科大学学报*,2015; 44(12):1137-1141.
- [13] Liang L, Song Y, Li L, et al. Adipose-derived stem cells combined with inorganic bovine bone in calvarial bone healing in rats with type 2 diabetes[J]. *J Periodontol*, 2014, 85(4):601-609.
- [14] 李广章,蒋召芹,刘志新.脂肪源干细胞移植骨质疏松模型大鼠骨密度及骨形态计量学指标的变化[J]. *中国组织工程研究*,2016,20(32):4825-4830.
- [15] Meng J, Ma X, Wang N, et al. Activation of GLP-1 receptor promotes bone marrow stromal cell osteogenic differentiation through  $\beta$ -catenin[J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 6(4):579-591.

(下转第 1211 页)

综上所述,高压氧联合神经生长因子局部注射能够显著改善骨折延迟愈合患者血清黏附因子及微循环指标,提高疗效,促进骨折愈合,值得在临床推广。

### 【参 考 文 献】

- [1] 林华.骨质疏松性骨折的临床评估和术后干预[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2017,10(1):2-6.
- [2] 秦集斌,宋洁富,薛旭红.原发性骨质疏松症的病因学研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(4):511-514.
- [3] 孙欣,孙杰聪,曾荣,等.骨质疏松性骨折与骨密度相关性实验研究[J].中国骨与关节损伤杂志,2016,31(5):503-505.
- [4] 刘建军,黄亮,韩庆斌,等. $\alpha$ -硫辛酸联合神经生长因子可促进股骨骨折的愈合[J].中国组织工程研究,2016,20(37):5477-5482.
- [5] 陈肖松,程迅生,马武秀,等.高压氧治疗海水浸泡兔胫骨开放性骨折的实验研究[J].中华航海医学与高气压医学杂志,2016,23(2):98-103.
- [6] 曾斌,田艳娟,压爱华.高压氧辅助治疗跟骨骨折术后切口愈合的临床疗效[J].宁夏医科大学学报,2016,38(2):212-213.
- [7] 中华医学会骨科学分会骨质疏松学组.骨质疏松性骨折诊疗指南[J].中华骨科杂志,2017,37(1):1-10.
- [8] 秦集斌,宋洁富,薛旭红.原发性骨质疏松症的病因学研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(4):511-514.
- [9] Lee MJ, Park SD, Kwon SW, et al. Relation between neutrophil-to-lymphocyte ratio and index of microcirculatory resistance in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention[J]. Am J Cardiol, 2016, 118(9): 1323-1328.
- [10] Uslu S, Irbani AG, Gereli A, et al. The effect of femoral nerve block on fracture healing via expressions of growth factors and  $\beta$ -catenin[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2016, 54(3):151-152.
- [11] 沈家峰,卢建华,徐孝平,等.红曲对去卵巢大鼠骨组织 RANKL/OPG 蛋白和 mRNA 表达的影响[J].中华中医药杂志,2018,33(4):1370-1372.
- [12] 芮丹云,唐丽媛,陈洁,等.补肾活血颗粒对骨质疏松大鼠骨组织中 OPG/RANKL mRNA 及蛋白表达的影响[J].中国老年学杂志,2015,35(24):7036-7038.
- [13] Ospinatasc ón G, Bautista D, Umaña M, et al. Relationship between microcirculatory alterations and venous-to-arterial carbon dioxide differences in patients with septic shock[J]. Intens Care Med, 2016, 42(2):211-221.
- [14] 陈辉,郭天刚,田新宇,等.丹参酮胶囊对创伤后骨折延迟愈合患者血清 sICAM-1、sVCAM-1、BMP-2 水平及微循环指标的影响[J].现代中西医结合杂志,2017,26(28):3111-3113.
- [15] Song JN, Liu ZW, Sui L, et al. Dynamic expression of nerve growth factor and its receptor TrkA after subarachnoid hemorrhage in rat brain[J]. Neural Regenerat Res (中国神经再生研究(英文版)), 2016, 11(8):1278-1284.
- [16] 高月,王国忠,郑自慧.高压氧治疗骨折延迟愈合的临床应用及作用机制[J].中华航海医学与高气压医学杂志,2016,23(1):83-84.
- [17] 丁洁,徐天睿.高压氧治疗胫骨中下段骨折愈合延迟的疗效观察[J].华西医学,2017,32(11):1763-1765.
- [18] 吕桂浩,蒋练,满城,等.神经生长因子对兔合并局部神经损伤的下颌骨骨折愈合中 BMP-2 表达的影响[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2016,30(7):535-537.
- [19] 闫献雨,赵治邦,樊文良,等.血清黏附分子及微量元素与胫腓骨骨折延迟愈合的关系分析[J].海南医学院学报,2017,23(1):107-109.
- [20] 蔡三,高丽萍,杨李军,等.血流变学指标及血清学指标在骨折延迟愈合患者中的临床意义[J].现代生物医学进展,2017,17(18):3517-3519.
- [21] 陈娟,谢丽华,李生强,等.hsa-miR-655 靶向 CLCF1 基因对成人骨肉瘤 MG63 细胞 OPG/RANKL 系统表达的影响[J].中国骨质疏松杂志,2017,23(11):1409-1414.
- [22] 刘康,吴凤晴,吴连国,等.强骨胶囊对骨质疏松大鼠 OPG/RANKL/RANK 系统的影响[J].中华中医药杂志,2016,31(3):1071-1073.

(收稿日期:2018-06-22;修回日期:2018-08-16)

(上接第1205页)

- [16] Kang ES, Kim DS, Han Y, et al. Three-Dimensional Graphene-RGD Peptide Nanoisland Composites That Enhance the Osteogenesis of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells.[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(3): 669.
- [17] Kim, SM, Yi SW, Kim JH, et al. Co-delivery of RUNX2-targeting miRNAs and shRNAs using nanoparticles composed of dexamethasone and PEI induces chondrogenesis of human mesenchymal stem cells [J]. J Biomed Nanotechnol, 2019, 15(1): 113-126.
- [18] Bruderer M, Richards RG, Alini M, et al. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis[J]. Eur Cell Mater, 2014, 28:269-286.
- [19] 黎裕明,雷爱凤,赵晓晓,等.microRNA-132 对脂肪源性间充质干细胞成骨分化的影响[J].广西医科大学学报,2019,36(2):187-191.
- [20] Komori Toshihisa. Signaling networks in RUNX2 - dependent bone development [J]. J Cell r Biochem, 2015, 112(3): 750-755.

(收稿日期:2019-02-14;修回日期:2019-03-20)