

脐带间充质干细胞治疗大鼠骨质疏松的初步研究

刘秋英¹ 利奕成¹ 何绍清² 罗振宇¹ 马岩岩¹ 林永亮¹ 罗勇¹ 钱垂文¹ 王一飞^{1*}

(¹暨南大学生物医药研究开发基地, 广州 510632; ²江西省宜春市万载中学, 宜春 336100)

摘要 选取40只雌性SD大鼠, 分为4组, 每组10只。除正常组(A组)外, 模型组(B组)、干细胞移植组(C组)和仙灵骨葆组(D组)均灌胃维甲酸70 mg/(kg·d), 连续灌胃14 d, A组用等量无菌水灌胃。B组注射生理盐水, C组尾静脉注射 2×10^6 脐带间充质干细胞, D组灌胃20 mg/kg仙灵骨葆。给药21 d后, 测量各组大鼠血清钙离子和磷含量的变化以及ALP和StrACP水平, 剥离大鼠右侧股骨并称量, 双能X线骨密度仪测量右侧股骨骨密度, 左侧骨切片进行电镜观察结构。结果表明, 维甲酸诱导的大鼠血清钙离子、磷含量及ALP活性比正常组显著升高, C组和D组治疗后比模型B组有所下降; B组StrACP活性较A组高, C组与A组无显著性差异。B组骨湿重比正常A组显著减少, C组和D组骨湿重与A组无显著性差异; 造模后B组骨密度显著下降, 给药后C组和D组骨密度与A组无显著性差异; B组骨胶原纤维排列杂乱无序, 结构松散并呈丝状, C组与B组相比, 骨胶原纤维排列呈束状, 走向一致, 排列规则、紧密, 恢复到与A组骨胶原相近形态和排列。结果提示, 注射脐带间充质干细胞对改善维甲酸诱导的大鼠骨质疏松有一定的治疗效果。

关键词 脐带间充质干细胞; 骨质疏松; 细胞治疗; 维甲酸

Effect of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Transplanting on Retinoic acid-induced Osteoporosis in Rats

Liu Qiuying¹, Li Yicheng¹, He Shaoqing², Luo Zhenyu¹, Ma Yanyan¹, Lin Yongliang¹, Luo Yong¹,

Qian Chuiwen¹, Wang Yifei^{1*}

(¹Biomedical Research and Development Centre of Jinan University, Guangzhou 510632, China;

²Wanzai Middle School of Yichun in Jiangxi Province, Yichun 336100, China)

Abstract To observe the therapeutic effect of umbilical cord mesenchymal stem cell on retinoic acid induced osteoporosis in female rats by intravenous injection, forty SD female rats were divided randomly into four groups: control group (Group A), model group (Group B), hUC-MSCs transplantation (Group C), and Xianling Gubao group (Group D). The rats in Group B, C and D were received retinoic acid at 70 mg/(kg·d) by gastric lavage for 14 days to induce osteoporosis instead of sterile water in Group A. At the same time, Group C were administered with 2×10^6 hUC-MSCs, Group D administered with 20 mg/kg Xianling Gubao, and Group B were administered with saline. After 21 days, the serum biochemical indicators, biomechanics characteristics were measured and microstructure of bone were also observed. The results showed that the concentration of Ca^{2+} , Pi and ALP

收稿日期: 2013-03-30 接受日期: 2013-09-02

中央高校基本科研业务费专项资金(批准号: 21612330)、广东省院士工作站建设项目(批准号: 2012B090500007)和广东省科技计划项目(批准号: 2011B040100019)资助的课题

*通讯作者。Tel: 020-85223426, E-mail: twangyf@jnu.edu.cn

Received: March 30, 2013 Accepted: September 2, 2013

This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities Project (Grant No.21612330), Academician Workstation Construction Projects in Guangdong Province (Grant No.2012B090500007) and Guangdong Province Science and Technology Project (Grant No.2011B040100019)

*Corresponding author. Tel: +86-20-85223426, E-mail: twangyf@jnu.edu.cn

网络出版时间: 2013-10-22 09:24 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131022.0924.001.html>

was increased apparently after RA induced, and it was recovered in Group B and C. The concentration of StrACP was increased in Group B and decreased in Group D vs Group A, but there was no difference in Group C. The wet weight of right femur was extremely decreased in Group B than Group A, and there was no difference statistically between Group C and D. The BMD was decreased after RA induced in Group B than Group A, and there was no difference between Group C and D. Examination of the collagenous fibers arrangement showed osseous collagen were deranged and surface loosening. Meanwhile, there was indication of repair in Group C. Taken together, these data suggested that RA-induced osteoporosis in rats could be relieved by injecting with umbilical cord mesenchymal stem cells.

Key words umbilical cord mesenchymal stem cells; osteoporosis; cell therapy; retinoic acid

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种以低骨量和骨组织微结构破坏为特征, 导致骨的脆性和骨折危险性增加的一种疾病。随着人类进入老龄化社会, 骨质疏松症及骨折的发病率呈迅速上升趋势, 严重威胁中老年人健康, 尤其以绝经后妇女为主, 研究发现雌激素水平下降是绝经后女性骨质疏松发生的重要因素^[1]。维甲酸在临床上有致骨质疏松的副作用, 常被用作诱导骨质疏松动物模型, 用于OP治疗药物的研究^[2-3]。

与骨髓等其他组织来源的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)相比较, 人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)能表达多种胚胎干细胞特有的分子标志, 如OCT-4、SOX-2、Nanog等, 具有分化潜能更大、增殖能力更强、免疫原性更低、取材方便、无道德伦理问题限制、易于工业化制备等特征, 在细胞治疗及再生医学组织工程研究中具有广阔的应用前景^[4-6]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验动物 6月龄SPF级雌性SD大鼠, 体重质量(302.8±6.8) g, 由暨南大学医学院实验动物中心提供(动物合格证: 2010A003)。各组大鼠单独喂养, 标准饲料, 含钙1%、磷0.74%, 自由饮水。

1.1.2 细胞 所有脐带标本取自暨南大学第一附属医院产科当日足月剖宫产健康婴儿的新鲜脐带, 经过贴壁法获得脐带间充质干细胞, 细胞强表达CD29、CD44、CD59和CD105, 弱表达CD28、CD31、CD34、CD40和CD86, 在相应的诱导条件下能向脂肪细胞和成骨细胞分化^[7]。本研究采用第3代细胞。

1.1.3 试剂 维甲酸(retinoic acid, RA)(江西泰欣诺实业有限公司, 100305), 仙灵骨葆胶囊(贵州同济堂

药业有限公司, 080622039), Ca测定试剂盒、Pi测定试剂盒、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒、抗酒石酸酸性磷酸酶(StrACP)试剂盒(南京建成生物工程研究所, 2010049)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型及给药 适应性喂养一周后, 大鼠按体重随机分为4组, A组: 正常对照组; B组: 模型组; C组: MSC移植组; D组: 仙灵骨葆组。除A组外, 其余各组大鼠于上午9:00灌胃维甲酸70 mg/kg造模, 每日一次, 连续灌胃14 d。在模型制备的第1~14 d的每天下午, D组按0.312 5 g/(kg·d)仙灵骨葆灌胃给药。C组分别于第1 d和第7 d每只大鼠以尾静脉注射方式移植第3代共 2×10^6 的hUC-MSCs, hUC-MSCs以200 μ L PBS悬匀。A组和B组中分别于第1 d和第7 d每只大鼠尾静脉注射200 μ L PBS。

1.2.2 实验动物生活习性观察及体重监测 实验期间密切观察大鼠生理反应及生活习性的变化情况, 注意大鼠皮毛色泽和鼠尾血液循环。实验过程中分别于第1, 7, 14, 21 d测量大鼠体重。第21 d处死大鼠, 并进行后续处理及各项指标测定。

1.2.3 血清骨代谢指标的测定 血清钙离子测定: 依据血清中钙离子在碱性溶液中与甲基百里香酚结合, 生成蓝色络合物。通过比色与钙标准进行比较, 计算钙的含量。按照试剂盒说明书在610 nm波长下用全自动分析仪测定, 得出吸光度值(D)进行计算。

血清磷测定: 采用孔雀绿直接显色法。按照血清无机磷测定试剂盒说明书在640 nm波长下用全自动分析仪测定并计算。

血清碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)测定: ALP分解磷酸苯二钠, 产生游离酚和磷酸, 酚在碱性溶液中与4-氨基安替比林作用经铁氰化钾氧化生成红色醌衍生物, 根据红色深浅可以确定酶活力

表1 各组大鼠的体重($n=6$)
Table 1 Body weight (BW) of each group ($n=6$)

组别 Group	体重(g) BW (g)			
	1 d	7 d	14 d	21 d
A	302.5±6.5	307.5±6.5	313.8±4.8 [△]	320.0±4.1 ^{△△}
B	302.5±11.9	298.8±10.3	295.0±10.8*	291.3±11.1**
C	302.5±5.0	300.0±7.1	297.3±7.5*	300.0±4.8**
D	303.8±4.8	301.9±7.3	303.8±9.8	296.3±12.8**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与A组比较; [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$, 与1 d组比较。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs A group; [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$ vs 1 d group.

的高低。按照ALP检测试剂盒说明书在520 nm波长处用全自动生化分析仪测定并计算。

抗酒石酸酸性磷酸酶(serum tartrate-resistant acid phosphatase, StrACP)测定: StrACP活性不被酒石酸抑制, 而其他酸性磷酸酶受到酒石酸抑制, 利用该原理, 可以测定血清中StrACP的活性。StrACP催化底物水解, 产生游离酚; 酚与重氮盐反应生成有色偶氮化合物, 在530 nm处比色测定, 通过计算测出酶活力。按照StrACP测定试剂盒说明书用紫外分光光度计测定并计算。

1.2.4 右侧股骨湿重的测定 剥离大鼠右侧股骨, 迅速用天平称量其湿重, 称量完毕后迅速浸泡于生理盐水中, -20°C 保存。

1.2.5 右侧股骨骨密度测定 将右侧股骨置于双能X线骨密度仪上, 计算机采用小动物分析软件, 自动分析股骨骨密度(bone mineral density, BMD)。扫描速度为10 mm/s, 扫描间距为0.5 mm×0.5 mm。

1.2.6 股骨三点弯曲试验 三点弯曲试验是反映长骨骨皮质的常用方法, 取测量完BMD的右侧股骨于室温下复温3~4 h, 测定前分别测量其中部两个相互垂直方向的直径值, 取平均值即为直径。根据三点弯曲试验的原理, 将股骨置于电子万能试验机上, 支点间距为20 mm, 加压点为 midpoint, 加载速度为2 mm/min, 计算机记录载荷-位移曲线, 测量最大载荷、弹性载荷、刚度及最大挠度等生物力学指标。

1.2.7 左侧股骨超微结构的观察 因实验通过灌胃给药及静脉注射, 可认为大鼠左右两侧股骨无差异, 又各指标的的处理方法不同, 所以上述的实验采用右侧骨完成, 而超微结构则取用左侧股骨。剔除左侧股骨, 用钢骨锯将股骨平均分为三段, 取股骨远侧1/3沿冠状面正中锯开, 暴露骨髓腔, 用生理盐水彻底清洗, 经固定、脱水、干燥和镀膜处理。临界

点干燥, 真空喷金镀膜, 制成1 mm×1 mm×1 mm标本。置于扫描电镜上观察。

1.3 统计学分析

所有数据采用均数±标准差表示, 采用SPSS 13.0统计软件分析, A组与B组各项指标采用组间两独立样本 t 检验, 判断造模是否成功。治疗各组间采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P<0.05$ 作为有显著性差异的检验标准。

2 结果

2.1 大鼠一般状态和体重情况

连续14 d造模和给药过程中, 大鼠陆续出现不同程度少食、竖毛、喜卧及体重减轻现象, 个别大鼠有口唇炎症状, 并出现个别死亡, 这可能与维甲酸的药物毒性有关。实验结束时, A组大鼠体重与实验前比较显著增加, 而BCD组大鼠与实验前比较没有显著性差异, 但大鼠普遍出现消瘦的情况。在实验前的随机分组并且大鼠体重相差不大的情况下, 实验结束时BCD组大鼠体重与A组比较显著降低($P<0.01$)(表1)。

2.2 血清钙离子和磷含量的变化

实验结果表明, 维甲酸灌胃后大鼠的血清钙含量均显著升高($P<0.05$)(表2)。血清磷含量除A组与B组间有显著性差异($P<0.01$)外, 其余各组与A组相比, 有所升高但无显著性差异(表2)。

2.3 血清ALP和StrACP含量的变化

实验21 d后, B、C、D组大鼠血清ALP与A组相比显著升高($P<0.01$), 但C组和D组血清ALP水平与B组比较显著回落($P<0.01$)(表3)。与A组正常组相比, B组StrACP显著上升($P<0.01$), C组与A组无显著性差异, D组显著降低($P<0.01$); C组较B组和D组均有显著性差异($P<0.05$)(表3)。

2.4 右侧股骨湿重的变化

与对照A组相比较, 模型B组右侧股骨湿重显著降低($P<0.01$); C组和D组大鼠右侧股骨湿重较B组有显著增加($P<0.05$), 并与A组无显著性差异(表4)。

2.5 各组大鼠右侧股骨骨密度变化

B组股骨骨密度与A组比较显著减少($P<0.01$), C组、D组与A组比较无显著性差异(表5)。

2.6 右侧股骨生物力学参数比较

右侧股骨三点弯曲试验中, 4组大鼠间最大载荷、弹性载荷、刚度和最大挠度间均有差异。其中, B组最大载荷、弹性载荷、刚度和最大挠度均显著

低于A组($P<0.05$ 或 $P<0.01$); C组较B组, 上述四个力学参数均有显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); C组与D组相比, 四个参数均有差异, 其中最大载荷、弹性载荷和刚度都有显著性升高($P<0.05$)(表6)。

2.7 左侧股骨超微结构的观察比较

左侧股骨的扫描电镜高倍镜下观察, B组骨胶原纤维排列杂乱无序, 结构松散并呈丝状。C组与B组相比, 骨胶原纤维排列呈束状, 走向一致, 排列规则、紧密, 恢复到与A组骨胶原相近的形态和排列(图1)。

表2 各组大鼠血清钙和磷含量($n=6$)
Table 2 The serum concentration of Ca^{2+} and Pi of each group ($n=6$)

组别 Group	钙(mmol/L) Ca^{2+} (mmol/L)	磷(mmol/L) Pi (mmol/L)
A	2.364±0.063	1.799±0.057
B	2.734±0.067*	1.979±0.025**
C	2.289±0.046** ^Δ	1.812±0.049 [#]
D	2.246±0.008**	1.801±0.018 [#]

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与A组比较; [#] $P<0.05$, 与B组比较, ^Δ $P<0.05$, 与D组比较。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs group A; [#] $P<0.05$ vs group B; ^Δ $P<0.05$ vs group D.

表4 各组大鼠右侧股骨湿重的变化($n=6$)
Table 4 The wet weight of right femur in each group ($n=6$)

组别 Group	骨湿重(g) Wet weight (g)
A	1.205 3±0.070 2
B	0.743 0±0.005 9**
C	1.271 8±0.022 5 ^{##}
D	1.220 3±0.048 8 ^{##}

** $P<0.01$, 与A组比较; ^{##} $P<0.01$, 与B组比较。

** $P<0.01$ vs group A; ^{##} $P<0.01$ vs group B.

表3 各组大鼠血清ALP和StrACP含量变化($n=6$)
Table 3 The serum concentration of ALP and StrACP of each group ($n=6$)

组别 Group	碱性磷酸酶 (金氏单位/100 mL) ALP (U/100 mL)	抗酒石酸酸性磷酸酶(U/L) StrACP (U/L)
A	12.229±1.002	20.289±3.805
B	29.287±0.707**	27.180±5.213*
C	27.257±1.364** ^{##ΔΔ}	18.248±3.016 ^{#Δ}
D	24.743±1.148** ^{##}	11.719±0.742**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与A组比较; [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$, 与B组比较; ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$, 与D组比较。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs group A; [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ vs group B; ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$ vs group D.

表5 各组大鼠BMD的变化($n=6$)
Table 5 The BMD of each group ($n=6$)

组别 Group	骨密度(g/cm^2) BMD (g/cm^2)
A	0.289 3±0.011 4
B	0.172 0±0.015 3**
C	0.299 0±0.015 6 ^{##}
D	0.288 5±0.010 9 ^{##}

** $P<0.01$, 与A组比较; ^{##} $P<0.01$, 与B组比较。

** $P<0.01$ vs group A; ^{##} $P<0.01$ vs group B.

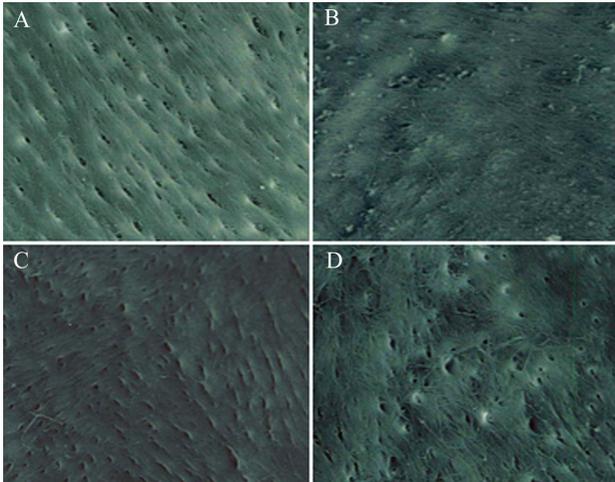
表6 各组大鼠右侧股骨三点弯曲试验结果($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 The results of three-point test of right femur in four groups ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别 Group	最大载荷(N) Maximal load (N)	弹性载荷(N) Elastic load (N)	刚度(N/mm) Stiffness (N/mm)	最大挠度(N/mm) Maximal deformation (N/mm)
A	143.55±9.11	80.21±1.61	234.58±3.70	0.87±0.07
B	84.22±10.37**	65.42±1.33**	186.25±4.47**	0.738±0.02*
C	117.61±6.67** ^{##Δ}	71.76±1.71** ^{#Δ}	210.38±1.33** ^{#Δ}	0.838±0.04 ^{#Δ}
D	101.67±4.53**	67.94±2.03**	206.44±2.14**	0.798±0.07

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与A组比较; [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$, 与B组比较; ^Δ $P<0.05$, 与D组比较。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs group A; [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ vs group B; ^Δ $P<0.05$ vs group D.



A: 正常对照; B: 模型对照; C: 尾静脉注射 2×10^6 脐带间充质干细胞; D: 灌胃20 mg/kg仙灵骨葆。

A: normal control; B: retinoic acid induced model control; C: 2×10^6 umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation group; D: 20 mg/kg Xianling Gubao group.

图1 各组胶原纤维排列(2 000 \times)

Fig.1 The collagenous fibers arrangement of four groups (2 000 \times)

3 讨论

维甲酸(retinoic acid, RA)作为目前研究颇热的抗肿瘤药, 临床上有致骨质疏松的副作用, 因此可用该药来建立骨质疏松的动物模型^[8-9]。该模型在发病症状、组织形态学表现及对雌激素的骨反应上与人类有较好的相似性, 是大鼠急性OP的有效造模方法^[10-11]。RA诱发OP的机理目前尚不完全清楚, 有体外细胞培养表明, RA可降低正常人成骨细胞(osteoblast, OB)的活性, 并能抑制破骨细胞(osteoclast, OC)的增殖, 抑制其产生ALP、骨钙素和IL-6^[12]。动物实验显示, RA对雌性大鼠骨代谢的影响是骨吸收大于骨形成, 既增加成骨细胞的数量和活性, 同时又刺激破骨细胞, 使其活性增强, 从而导致类似骨高转换状态, 同时发生卵巢损伤和功能减退^[13]。

骨在整个生命过程中都在进行新陈代谢, 即OB不断形成新骨, OC则在不断吸收旧骨。代谢过程能较好地反映OB和OC的活性, 以及骨基质和骨矿质的变化^[14]。钙和磷主要反映骨基质和骨矿质的变化, 临床上主要通过测定血、尿中骨矿物质如血清离子钙、总钙、无机磷、镁等矿物质的浓度间接了解体内骨代谢的状况。本实验中测定血清离子钙及无机磷水平的结果表明, 骨质疏松模型B组血清离子钙水平显著升高, 而注射hUC-MSCs组和仙灵骨葆组

的离子钙水平有所降低, 并与A组相比并无显著差异。血清磷除了B组有明显的升高($P < 0.01$), 其余各组未见有明显变化。这表明, hUC-MSCs在稳定和平衡血清钙磷含量方面有一定的作用。

ALP是反应OB活性的主要指标, 由OB分泌的非胶原蛋白, 对钙和磷羟磷灰石具有很强的亲和力, 能够启动和加速骨基质的钙化。StrACP主要由OC释放, OC活性增强, 皱褶缘分泌StrACP随之增加, 其含量水平可反应OC活性及骨吸收状态。本实验的结果显示, B组ALP、StrACP均显著增加, 说明该模型确为高转换型的OP模型。C组及D组ALP水平均显著下降($P < 0.05$), 这表明hUC-MSCs在抑制OC分泌StrACP上有一定的作用, 但是同时ALP水平也受到一定程度抑制。因此, 如何利用hUC-MSCs在抑制骨吸收的同时增强OB的骨形成活性, 对综合改善高转换型OP至关重要。

骨密度(bone mineral density, BMD)即骨量, 是指骨矿物质和骨基质的总和。BMD是反应骨强度的重要指标, 一般以骨矿物的含量代替骨量进行BMD测定。BMD及骨矿物含量水平是衡量骨质水平最有效的指标之一。双能X线骨密度仪(DEXA)准确度和精确度高, 辐射剂量低, 扫描时间短, 广泛用于临床。本实验中, RA造模OP大鼠3周后, C组骨密度较B组显著增加($P < 0.05$), C组较A组比较无显著性差异; D组较B组也有显著增加($P < 0.05$)。以上结果表明, RA造模的OP大鼠尾静脉注射移植hUC-MSCs对股骨的BMD有明显促增加作用, 并且恢复到与A组相当水平, 这表明hUC-MSCs在一定程度上可有效阻止RA诱发的骨量丢失。

伍贤平等^[15]研究发现, 主要以承重为受力方式的股骨, 抗弯试验的受力区域几乎均为皮质骨结构, 其抗弯系数、弹性弯距和最大弯距与鼠的全身总体骨量和股骨的整体骨量及鼠体重呈良好的正相关关系, 提示随着鼠骨量的增加, 股骨抵抗外力破坏的能力越强。本实验的生物力学结果印证了已有研究结果, 并与骨密度指标相互呼应。股骨抗弯曲强度是临床表征中最直接反应骨质疏松的指标, 本研究结果表明静脉注射移植hUC-MSCs对缓解甚至恢复骨质疏松症状有明显效果。

骨基质的有机质主要成分为胶原, 胶原相互交织形成立体结构, 决定骨韧性。OP的病理学改变包括质和量两方面, 量变主要体现在BMD的下降, 而

质变则表现在骨小梁的生长状况、骨矿化程度、骨质的堆积范围、微损伤等区域组织形态学的改变, 如骨小梁断裂、稀疏, 骨胶原的断裂、排列文宽、小梁骨体积下降等。本实验扫描电镜高倍镜下观察到B组模型组的大鼠左侧股骨骨胶原纤维杂乱、结构松散无序, 细胞移植组C组的大鼠股骨骨胶原纤维较B组排列紧密规则, 这表明hUC-MSCs有一定的改善骨微观结构的作用。

综上所述, 本实验应用尾静脉注射方式移植hUC-MSCs, 3周后检测结果表明, hUC-MSCs能增加OP动物BMD, 改善骨的超微结构, 有效抑制了骨丢失, 为今后在临床上的应用提供实验依据。

参考文献 (References)

- Christenson ES, Jiang X, Kagan R, Schnatz P. *Minerva Ginecol* 2012; 64(3): 181-94
- Wei M, Yang Z, Li P, Zhang Y, Sse WC. Anti-osteoporosis activity of naringin in the retinoic acid-induced osteoporosis model. *Am J Chin Med* 2007; 35(4): 663-7
- Conaway HH, Pirhayati A, Persson E, Pettersson U, Svensson O, Lindholm C, *et al*. Retinoids stimulate periosteal bone resorption by enhancing the protein RANKL, a response inhibited by monomeric glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 2011; 286(36): 31425-36.
- Moroni L, Fornasari PM. Human mesenchymal stem cells: A bank perspective on the isolation, characterization and potential of alternative sources for the regeneration of musculoskeletal tissues. *J Cell Physiol* 2013; 228(4): 680-7.
- Al-Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D, Bouslimi A, Al-Jassir F, Megges M, *et al*. Human stromal (Mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev* 2013; 9(1): 32-43.
- Santos JM, Barcia RN, Simoes SI, Gaspar MM, Calado S, Agudoce A, *et al*. The role of human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells (UCX (R)) in the treatment of inflammatory arthritis. *J Transl Med* 2013; 11: 18.
- 何绍清, 罗振宇, 刘秋英, 周向荣, 邓铭权, 罗新, 等. 人脐带间充质干细胞分离培养及向脂肪细胞与成骨细胞的分化. *中国组织工程与临床康复*(He Shaoqing, Luo Zhenyu, Liu Qiuying, Zhou Xiangrong, Deng Mingquan, Luo Xin, *et al*. Isolation of human umbilical cord mesenchymal stem cells and differentiation into adipocytes and osteoblasts. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*) 2010; 14(14): 2492-6.
- 许鹏, 郭雄, 张银刚, 李幼芬, 曹峻岭, 熊咏民. 维甲酸诱导骨质疏松模型大鼠的效果及机理. *四川大学学报(医学版)*(Xu Peng, Guo Xiong, Zhang Yingang, Li Youfen, Cao Junling, Xiong Yongmin. The effect of retinoic acid on induction of osteoporotic model rats and the possible mechanism. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*) 2005; 36(2): 229-32.
- Hotchkiss CE, Latendresse J, Ferguson SA. Oral treatment with retinoic acid decreases bone mass in rats. *Comp Med* 2006; 56(6): 502-11.
- 李银清, 赵雨, 孙晓迪, 曲晓波. 梅花鹿茸胶原酶解物对维甲酸致大鼠骨质疏松防治作用的实验研究. *中国中药杂志*(Li Yinqing, Zhao Yu, Sun Xiaodi, Qu Xiaobo. Prevention and therapeutic effects of sika deer velvet collagen hydrolysate on osteoporosis in rats by retinoic acid. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*) 2010; 35(6): 759-62.
- 许碧莲, 崔燎, 陈文双, 魏天佑, 吴铁. 丹参骨宝对维甲酸模型大鼠股骨生物力学及骨密度的影响. *生物医学工程学杂志*(Xu Bilian, Cui Liao, Chen Wenshuang, Wei Tianyou, Wu Tie. Effects of DanShenGuBao on biomechanical properties and bone mineral density of femur induced by retinoic acid in rats. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*) 2010; 27(2): 307-10.
- Ahmed N, Sammons J, Khokher MA, Hassan HT. Retinoic acid suppresses interleukin 6 production in normal human osteoblasts. *Cytokine* 2000; 12(3): 289-93.
- Tedeschi-Blok N, Lee M, Sison JD, Miike R, Wrensch M. Inverse association of antioxidant and phytoestrogen nutrient intake with adult glioma in the San Francisco Bay Area: A case-control study. *BMC Cancer* 2006; 6: 148.
- Hahn M, Vogel M, Pompesius-Kempa M, Delling G. Trabecular bone pattern factor—a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone* 1992; 13(4): 327-30.
- 伍贤平, 廖二元, 陆泽元, 宋先村, 黄干, 邓小戈. 大鼠骨量与骨生物力学特性之间的相关性. *中国骨质疏松杂志*(Wu Xianping, Liao Eryuan, Lu Zeyuan, Song Xiancun, Huang Gan, Deng Xiaoge. Correlations between bone mechanical properties and bone mass in rats. *Chinese Journal of Osteoporosis*) 1999; 5(3): 1-4.