

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.01.003

View this article at: <https://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2022.01.003>

## 脐带间充质干细胞对 CoCrMo 磨损微粒诱导的 小鼠颅骨溶解的影响

王帅<sup>1,2</sup>, 邓展涛<sup>2</sup>, 马元琛<sup>2</sup>, 郑秋坚<sup>1,2</sup>

[1. 华南理工大学医学院, 再生医学联合研究中心, 广州 510006;  
2. 广东省人民医院(广东省医学科学院)骨科中心, 广州 510080]

**[摘要]** 目的: 探究人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)通过抑制炎症反应在CoCrMo磨损微粒(CoCrMo wear particles, CoPs)诱导的小鼠颅骨溶解动物模型中的保护作用。方法: 使用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)、透射电镜(transmission electron microscope, TEM)、能谱分析(energy dispersive spectroscopy, EDS)、X射线衍射仪(X-ray diffraction, XRD)探测CoPs的形貌、粒径分布、化学成分百分比以及物相成分分析。使用微型计算机断层扫描(micro-computed tomography, Micro-CT)和三维重建分析来对小鼠颅骨骨质丢失程度进行影像学 and 定量的分析。通过甲苯胺蓝染色、苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin, HE)和抗酒石酸酸性磷酸酶染色(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)鉴定小鼠颅骨组织骨溶解的组织学差异。使用ELISA检测试剂盒对CoPs诱导的无菌性松动的小鼠模型的骨膜组织中的炎症因子肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )的表达差异进行鉴定。结果: CoPs主要由C、Cr7C3、Mo2C、Co和CoMoO4组成,并在SEM和TEM中表现为表面较为光滑的球状。为探究hUCMSCs对CoPs诱导小鼠颅骨骨溶解的影响,首先利用Micro-CT扫描小鼠颅骨样本,结果显示:相比于单次hUCMSCs注射组,多次hUCMSCs注射组能明显改善骨质丢失的情况。与单次hUCMSCs注射组相比,多次hUCMSCs注射组HE染色和甲苯胺蓝染色显示颅骨的骨丢失较轻且范围较小,TRAP染色显示破骨细胞活性较低。小鼠颅骨骨膜中的TNF- $\alpha$ 表达呈现出hUCMSCs的剂量依赖性降低。结论: hUCMSCs在CoPs诱导的小鼠颅骨溶解动物模型中发挥保护作用,而调节小鼠颅骨骨膜组织的炎症反应水平可能是hUCMSCs影响磨损微粒诱导的无菌性松动的一种调节机制。

**[关键词]** 人脐带间充质干细胞; 骨溶解; CoCrMo磨损微粒; 无菌性松动; 动物模型

收稿日期 (Date of reception): 2021-01-24

通信作者 (Corresponding author): 郑秋坚, zhengqiujian@gdph.org.cn; 邓展涛, dengzhanhao@gdph.org.cn

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金青年项目 (81802222); 广东省自然科学基金 (2018A030310694, 2020A1515010268, 2021A15150110008); 广东省中医药局科研项目 (20191004); 广东省人民医院优秀青年人才计划 (KJ012019091); 中央高校基本科研业务费专项资金 (2020ZYGXZR010); 广东省医学科学技术研究基金 (A2019461); 广州市科技计划项目 (201904010424)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China Youth Science Foundation (81802222), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2018A030310694, 2020A1515010268, 2021A15150110008), the Foundation of Traditional Chinese Medicine of Guangdong Province (20191004), the Outstanding Young Talents Foundation of Guangdong Provincial People's Hospital (KJ012019091), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2020ZYGXZR010), Medical Science and Technology Research Foundation of Guangdong Province (A2019461), and Program of Science and Technology of Guangzhou (201904010424), China.

# Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells in CoCrMo wear particles-induced murine calvarial osteolysis

WANG Shuai<sup>1,2</sup>, DENG Zhantao<sup>2</sup>, MA Yuanchen<sup>2</sup>, ZHENG Qiujuan<sup>1,2</sup>

(1. School of Medicine, South China University of Technology, Joint Center for Regenerative Medicine Research, Guangzhou 510006;

2. Department of Orthopedics, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the protective effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) in animal model with CoCrMo wear particles (CoPs)-induced murine calvarial osteolysis by inhibited inflammatory reaction. **Methods:** Scanning electron microscope (SEM), transmission electron microscope (TEM), energy dispersive spectroscopy (EDS) and X-ray diffraction (XRD) were used to examine the morphology, particle size distribution, chemical composition ratio and phase analysis of CoPs. Micro-computed tomography (Micro-CT) and 3-dimensional reconstruction analysis were used for quantification of the degree of murine calvarial bone loss. Toluidine blue staining, hematoxylin-eosin (HE) staining and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining were applied to detect histologic changes of murine calvarial osteolysis. The ELISA kit was used to assess the difference in expression of inflammatory cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in murine calvarial periosteum tissue induced by CoPs in aseptic osteolysis. **Results:** CoPs were constituted by C, Cr7C3, Mo2C, Co and CoMoO<sub>4</sub>, and appeared as a spherulite with a relatively smooth surface detected by SEM and TEM. The implantation of CoPs-induced murine calvarial osteolysis in the mouse model used to investigate the protective effect of hUCMSCs showed that repeated hUCMSCs injection could significantly ameliorate bone loss than single hUCMSCs injection did when scanned with Micro-CT and analysed by 3-dimensional reconstruction. Repeated injection of hUCMSCs significantly showed lower bone loss than single hUCMSCs injection did as detected by HE staining and toluidine blue staining. Repeated hUCMSCs injection also led to less activated osteoclasts by TRAP staining when compared with single hUCMSCs injection. The expression of TNF- $\alpha$  in murine calvarial periosteum tissue represented a hUCMSCs-dose-dependent reduction. **Conclusion:** hUCMSCs has a protective effect in CoPs-induced murine calvarial osteolysis animal model, while regulating inflammatory responses in murine calvarial periosteum tissue may be the regulatory mechanism for the effect of hUCMSCs injection therapy in wear particles-induced aseptic loosening.

**Keywords** human umbilical cord mesenchymal stem cells; osteolysis; CoCrMo wear particles; aseptic loosening; animal model

全髋关节置换术(total hip arthroplasty, THA)是治疗多种终末期关节疾病的一种标准治疗方法, 例如骨性关节炎(osteoarthritis, OA), 类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)和严重创伤等, 它能显著减少患者疼痛, 改善关节功能, 提高患者的生活质量<sup>[1]</sup>。但是由于骨溶解引起的假体无菌性松动, 以及其伴随的关节疼痛和机械性不稳定成为了严重限制THA成功率的主要因素<sup>[2]</sup>。目前假体无菌性松动较为公认发病机制是假体和骨骼之间形成的磨损微粒

诱导了局部的慢性炎症, 进一步引起成骨细胞的骨生成和破骨细胞的骨吸收之间的不平衡, 最终导致局部骨溶解及无菌性松动的发生<sup>[3-5]</sup>。因此, 探索一种安全有效的治疗和预防骨溶解的方法显得尤为迫切。

在骨生成和骨骼疾病治疗过程中, 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的迁移和分化成为软骨细胞或者成骨细胞的能力起至关重要的作用<sup>[6]</sup>。MSCs作为结缔组织细胞的前体细胞, 可以从成人多种不同的器官和组织中分离出来, 如

骨髓、脂肪、软骨、骨、肌肉、乳牙髓、滑膜、皮肤、胎盘、羊膜和脐带中的华通胶<sup>[7-10]</sup>, 并拥有三系分化的能力(骨、软骨和脂肪)。与此同时, 最新研究<sup>[8,11-12]</sup>发现MSCs还具有强大的免疫调节和抗炎活性。在MSCs的众多来源中, 人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)具有提取方便、增殖快、成本低、无创收集、多能性、低感染风险、增殖因子高、免疫原性低等多种优点, 可能会成为临床治疗性干细胞注射的理想来源<sup>[13-14]</sup>。有研究<sup>[15-16]</sup>发现: hUCMSCs以及hUCMSCs的外分泌蛋白能通过恢复骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)的成骨分化潜能, 进一步延缓局部的骨质丢失, 增加局部相应的骨密度, 进而达到对老年性骨质疏松症的治疗效果。同时有研究<sup>[17-18]</sup>表明hUCMSCs与支架的联合应用在骨和软组织的组织再生工程中能极大地促进组织的再生和修复。然而目前尚未有研究涉及hUCMSCs对无菌性松动的影响。本研究采用CoCrMo磨损微粒(CoCrMo wear particles, CoPs)诱导小鼠颅骨溶解动物模型, 并行hUCMSCs局部注射移植, 探讨hUCMSCs对CoPs诱导的骨溶解的影响, 为间充质干细胞应用于THA晚期并发症无菌性松动的预防和治理提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人脐带间充质干细胞由健康产妇自愿捐赠的脐带组织中的华通胶分离提取, 由国家组织工程种子细胞库华南分库、广州杜德生物科技有限公司提供分离培养所得的人脐带间充质干细胞悬浮液( $1 \times 10^6$ /mL), 所有关于hUCMSCs的细胞实验包括组织提取、干细胞分离培养等均遵守《中华人民共和国人类遗传资源管理条例》, 并经广东省人民医院医学伦理委员会审核批准。C57BL/J6小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。CoPs来源于1位患有无菌性松动的患者经过翻修手术后取得的假体。肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )ELISA检测试剂盒购自江苏省苏州市太仓市依科赛生物科技(太仓)有限公司。

### 1.2 CoPs 的制备和理化性质分析

实验均按照中国相关地方法律要求的指导原

则进行, 并获得患者的知情同意。将CoCrMo假体置于高真空、三电极直流电中, 在 $10^{-3}$  Pa真空、0.04 MPa氩气和氢气(3:2, vol/vol)、650 A负极电流下获得CoPs。将CoPs放入133 Pa、80 °C的真空干燥箱(DZF-6012)中干燥12 h, 干燥后将少量CoPs粘在导电胶上, 后粘贴在锡板上, 通过场发射扫描电镜(scanning electron microscope, SEM, Merlin, Carl Zeiss AG, Germany)检测CoPs的外形。在通过透射电镜(transmission electron microscope, TEM; Talos L120C, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)扫描CoPs之前, 将CoPs重悬在无水乙醇中, 然后CoPs重悬液需要用超声波震荡30 min, 将100  $\mu$ L悬液滴到金属板上, 白炽灯下烘烤5 min。在钨灯丝扫描电镜(Q25, FEI, Bruker Nano GmbH Berlin, Germany)上用能谱分析(energy dispersive spectrometer analysis, EDS)对其化学元素成分进行定量分析。在X射线衍射仪(X-ray diffraction, XRD, Empyrean, PANalytical B.V., Netherlands)上进行物相成分分析, 根据XRD仪器原理, 布拉格方程( $d = \frac{\lambda}{2 \sin \theta}$ )“d”代表的是晶面间距, “ $\theta$ ”为入射X射线与相应晶面的夹角, “ $\lambda$ ”为X射线的波长, 在XRD仪器中X射线的波长是固定已知的( $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ )(图1)。以上理化性质的鉴定均在华南理工大学医疗器械研究检测中心完成。将高压灭菌(125 °C, 25 min)后的CoPs以100 mg/mL的浓度重悬在磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer solution, PBS)作为CoPs的原溶液。

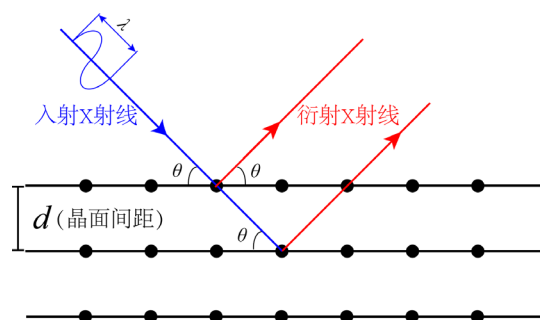


图1 布拉格方程演示图

Figure 1 Diagram of Bragg's law

布拉格方程表明只有X射线照射到相邻两晶面的光程差是X射线波长时才产生衍射。

The Bragg's law means that diffraction of X-rays occurs only when the optical path difference between two adjacent crystal surfaces is the wavelength of an X-ray.

### 1.3 小鼠颅骨溶解动物模型构建

小鼠颅骨溶解动物模型的建立参考前期研究<sup>[9]</sup>。取C57BL/J6小鼠(6周, 雌性, 15.6~18.5 g), 1%戊巴比妥钠(0.15 mL/只)腹腔注射麻醉后, 将小鼠俯卧位固定于手术操作台上, 小鼠头部术区备皮后, 用0.15%的碘伏消毒3遍, 铺无菌巾单, 取小鼠头部前正中沿着两眼和两耳之间的中线切开颅骨的皮肤约1 cm, 显露1 cm×1 cm大小的骨膜区域, 通过尖锐的手术刀片将暴露部分的骨膜与颅骨分离。缝合伤口后将50 μL的浓度为80 mg/mL的CoPs悬浮液注入到伤口正中的皮下。术后腹腔注射青霉素防止感染。

### 1.4 hUCMSCs的注射及实验分组

小鼠颅骨溶解动物模型建立成功后, 将小鼠分为假手术组(sham-operated group, Sham)、模型组(CoPs)、单次hUCMSCs注射组和多次hUCMSCs注射组, 每组8只。Sham组的小鼠在颅骨溶解动物模型的建立过程中用50 μL PBS缓冲液替代CoPs悬浮液注入伤口皮下, 作为手术过程的空白对照。单次hUCMSCs注射组的小鼠在颅骨溶解模型建立术后第1天于伤口皮下注射50 μL人脐带间充质干细胞悬浮液( $1 \times 10^6$ /mL)1次, 即每次每只小鼠注射人脐带间充质干细胞 $5 \times 10^4$ 于颅骨伤口皮肤下。多次hUCMSCs注射组的小鼠在颅骨溶解模型建立术后第1天、第7天和第14天分别于伤口皮下注射50 μL人脐带间充质干细胞悬浮液( $1 \times 10^6$ /mL), 共注射3次。所有小鼠在颅骨溶解模型建立3周后处死, 取出颅骨表面的骨膜组织和颅骨样本用于下一步研究。

### 1.5 Micro-CT和三维重建分析

使用微型计算机断层扫描成像技术(micro-computed tomography, Micro-CT;  $\mu$ CT100, Scanco Meical AG, Switzerland)对小鼠颅骨进行扫描和分析。扫描间隙18 μm, X射线参数设置为45 kV、550 μA。在颅骨样本扫描前, 清除颅骨表面含有磨损微粒的结缔组织以消除其对成像的影响。扫描后使用公司配套的专用软件进行三维重建和数据分析, 于颅骨中线附近选取固定区域定量计算骨密度(bone mineral density, BMD)和骨体积分数(bone volume/total volume, BV/TV)。

### 1.6 颅骨组织病理学染色

颅骨组织取下后, 在体式显微镜下去除颅骨

表面附着的软组织, 于4%多聚甲醛溶液中4 ℃过夜固定。每组选取2份颅骨样本进行甲苯胺蓝染色, 0.05%甲苯胺蓝染色液浸泡2 min。其余颅骨样本于10% EDTA-PBS溶液(pH 7.4)4 ℃下脱钙2周后, 组织脱水包埋于石蜡。石蜡组织切片4~5 μm。将颅骨组织石蜡切片依次浸入二甲苯、梯度乙醇溶液、苏木精染液、伊红染色进行HE染色(Solarbio Life Sciences)。将颅骨组织切片依次浸入二甲苯脱蜡、TRAP染色工作液37 ℃下避光孵育1 h、苏木精染液复染2 min进行抗酒石酸酸性磷酸酶染色(TRAP, Sigma)。光学显微镜拍照。

### 1.7 ELISA法检测TNF-α水平

取适量颅骨表面的骨膜组织, 移入玻璃匀浆器, 加入预冷的1 mL RIPA(强)裂解液(含1%PMSE和蛋白酶抑制剂)进行充分的研磨, 该过程在冰上进行。将制备的组织匀浆液于低温离心机(4 ℃, 5 000 r/min)离心10 min, 取上清备用检测。采用TNF-α的ELISA检测试剂盒, 严格按照试剂盒说明操作, 检测各组小鼠颅骨骨膜组织中TNF-α的表达水平。

### 1.8 统计学处理

使用GraphPad Prism 8软件(GraphPad, San Diego, CA, USA)进行统计学分析, 计量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。使用单因素方差分析(ordinary one-way analysis of variance, ANOVA)来分析组间差异, 结合Bonferroni多重比较检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CoPs的理化性质分析

使用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)、透射电镜(transmission electron microscope, TEM)镜下观: CoPs呈现为表面较为光滑的球体, 粒径分布在59.5~394.5 nm(图2A、2B)。根据TEM镜下观察结果统计CoPs粒度分布主要集中在30~40 nm(图2C)。CoPs的化学元素主要由碳(C)、氧(O)、钴(Co)、铬(Cr)、钼(Mo)和硅(Si)组成(图3), 所占的元素成分百分比为C(47.62%)、O(5.84%)、Co(29.94%)、Cr(15.09%)、Mo(0.03%)和Si(0.97%)(表1)。通过XRD对CoPs的物相成分分析得到, CoPs主要是由C、Cr<sub>7</sub>C<sub>3</sub>、Mo<sub>2</sub>C、Co和CoMoO<sub>4</sub>化合物组成(图4)。

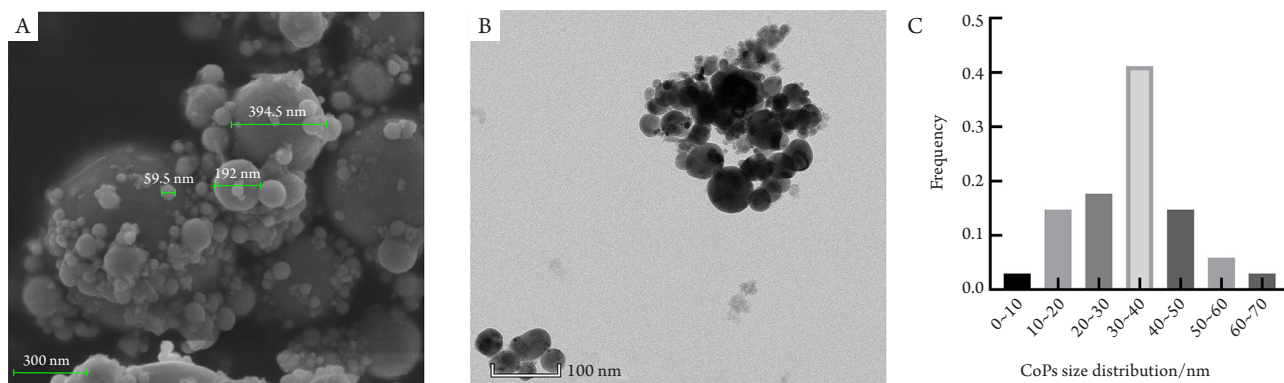


图2 CoPs在电子显微镜中的图片以及微粒的粒径分布情况

Figure 2 Image of CoPs in the electron microscope and CoPs size distribution

(A)扫描电镜; (B)透射电镜; (C)CoPs粒径分布图。

(A) Scanning electron microscope; (B) Transmission electron microscope; (C) CoPs size distribution.

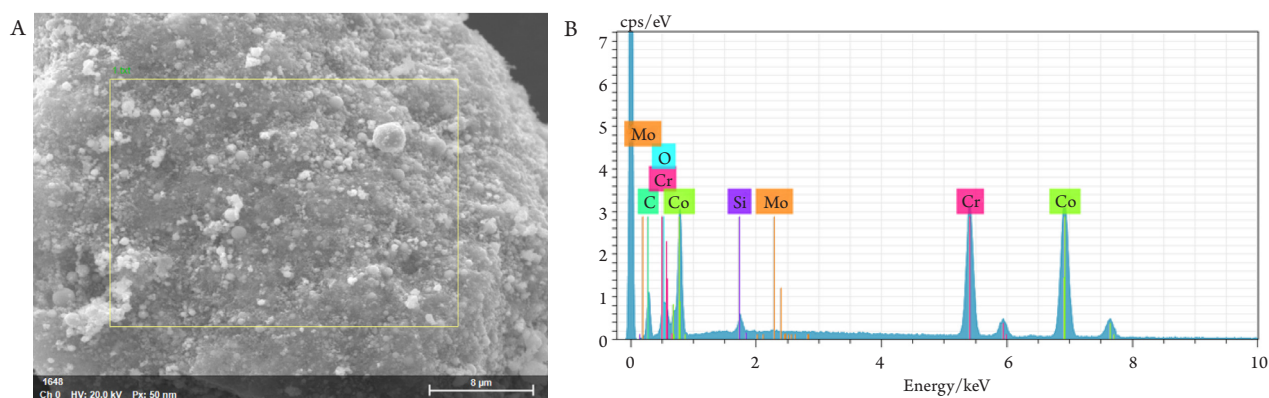


图3 CoPs的主要化学组成成分

Figure 3 Main chemical element compositions of the CoPs

(A)CoPs在SEM中的图片, 黄色框为选取的光谱分析区域; (B)CoPs通过扫描分析得到的能谱图。

(A) The image of CoPs in SEM. The yellow box is the selected CoPs for spectral analysis; (B) The energy dispersive spectrometer graph for the CoPs by scanning and analyses.

表1 CoPs的各化学元素百分比

Table 1 Atomic percent (%) of each element chemical composition of CoPs

元素名称	次数	Co/%	Cr/%	Mo/%	C/%	O/%	Si/%
原子	1	34.70	15.69	0.03	41.97	5.49	0.59
	2	27.52	14.80	0.06	50.43	6.03	1.16
	3	27.60	14.79	0.00	50.46	6.01	1.15
平均值		29.94	15.09	0.03	47.62	5.84	0.97
标准差		4.12	0.52	0.03	4.89	0.31	0.33

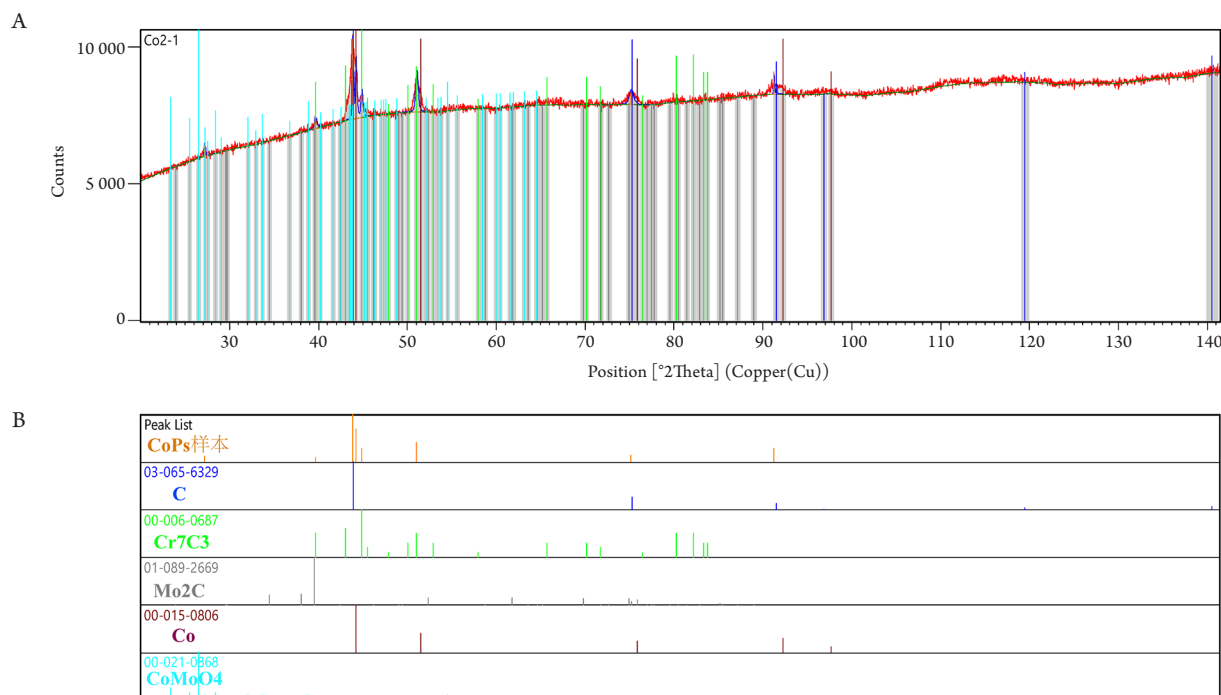


图4 CoPs在X射线衍射仪(XRD)的物相成分分析

Figure 4 Phase analysis of CoPs by XRD

(A)CoPs通过XRD得到的衍射模式图；(B)CoCrMo所得数据通过与ICDD PDF-2数据库匹配分析，CoPs主要是由C(ICDD文献编号：03-065-6329)、Cr<sub>7</sub>C<sub>3</sub>(ICDD文献编号：00-006-0687)、Mo<sub>2</sub>C(ICDD文献编号：01-089-2669)、Co(ICDD文献编号：00-015-0806)和CoMoO<sub>4</sub>(ICDD文献编号：00-021-0868)化合物组成。

(A) The diffraction pattern of CoPs by XRD instrument; (B) The data set was analyzed with the ICDD PDF-2 database. The main phases of CoPs are probably constituted by C (ICDD: 03-065-6329), Cr<sub>7</sub>C<sub>3</sub> (ICDD: 00-006-0687), Mo<sub>2</sub>C (ICDD: 01-089-2669), Co (ICDD: 00-015-0806) and CoMoO<sub>4</sub> (ICDD: 00-021-0868).

## 2.2 hUCMSCs 对小鼠颅骨溶解的影响

通过对各组所提取的小鼠颅骨样本组织进行Micro-CT扫描和三维重建数据分析颅骨组织骨缺损情况。影像学图像显示(图5A)：与模型组及单次hUCMSCs注射组相比，多次hUCMSCs注射组小鼠颅骨溶解水平显著好转，颅骨组织骨缺损面积显著缩小，缺损程度较浅。三维重建后数据分析可得(图5B)：与模型组和单次hUCMSCs注射组的数据相比，多次hUCMSCs注射组的BMD和BV/TV有明显增加。多次hUCMSCs注射组的BMD与模型组( $P=0.0046$ )和单次hUCMSCs注射组( $P=0.0024$ )相比，差异有统计学意义。多次hUCMSCs注射组的BV/TV与模型组( $P=0.0203$ )和单次hUCMSCs注射组( $P=0.0237$ )相比，差异有统计学意义。

为进一步探究hUCMSCs对CoPs诱导的小鼠颅骨溶解的影响，我们用组织化学染色法，分别通过甲苯胺蓝染色、HE染色和TRAP染色对各组颅骨样本的组织学差异进行鉴别。甲苯胺蓝的颅骨整体染色图像显示(图6A)：多次hUCMSCs注射组相较于模

型组和单次hUCMSCs注射组，颅骨表面的骨溶解程度明显降低。HE染色结果同样表明(图6B)：多次hUCMSCs注射组相较于模型组和单次hUCMSCs注射组，骨溶解程度得到较好的缓解。我们还使用TRAP染色检测了各组小鼠颅骨中活化的破骨细胞数量的差异，黑色箭头所指红色多核细胞代表活化的破骨细胞，结果显示(图6C)：多次hUCMSCs注射组相较于模型组和单次hUCMSCs注射组，活化的破骨细胞数量有着明显减少。各组小鼠颅骨的组织学差异与Micro-CT扫描和三维重建后数据分析的结果一致。

## 2.3 hUCMSCs 对小鼠颅骨局部炎症反应的影响

为进一步探究hUCMSCs对于CoPs诱导的小鼠颅骨溶解的局部炎症反应的影响，我们检测了各组小鼠颅骨局部的骨膜组织中的炎症因子TNF- $\alpha$ 的表达水平，结果显示(图7)：多次hUCMSCs注射组的小鼠颅骨骨膜组织中的TNF- $\alpha$ 的表达水平明显低于模型组( $P<0.0001$ )和单次hUCMSCs注射组( $P<0.0001$ )。

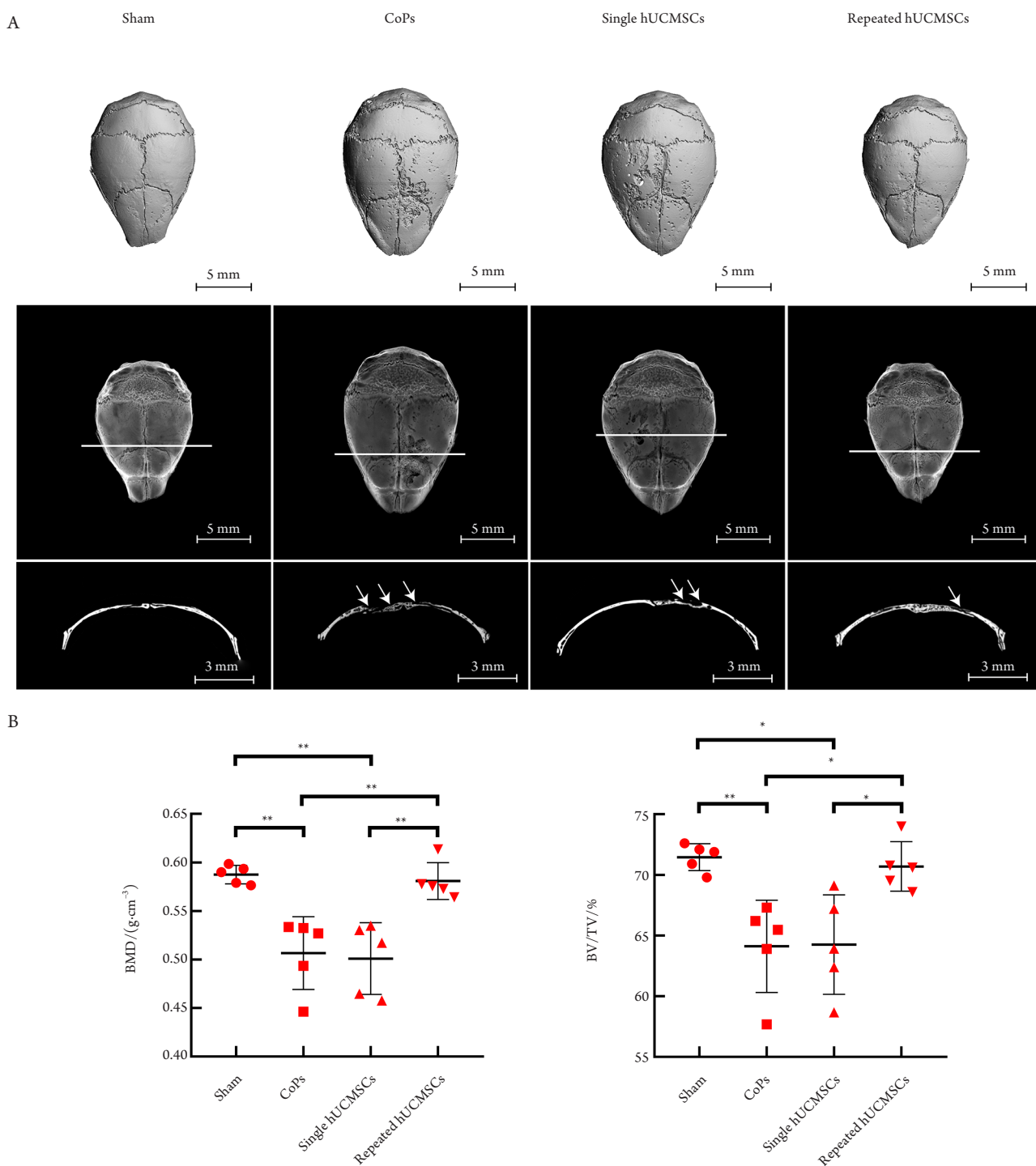


图5 小鼠颅骨溶解动物模型的颅骨组织的Micro-CT、三维重建图像以及定量分析

Figure 5 Images of Micro-CT and 3-dimensional reconstruction and quantitative analysis for the calvarial caps of murine calvarial osteolysis animal model

(A) 三维重建和Micro-CT横断面图，白色箭头代表骨溶解部位；(B) 小鼠颅骨溶解动物模型的颅骨定量分析BMD和BV/TV。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 每组5只小鼠。

(A) Images of 3-dimensional reconstruction and cross-section of Micro-CT. The white arrows indicate where murine calvarial osteolysis occurred; (B) The quantitative analysis of murine calvarial osteolysis animal model: BMD and BV/TV. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 5$  mice in each group.

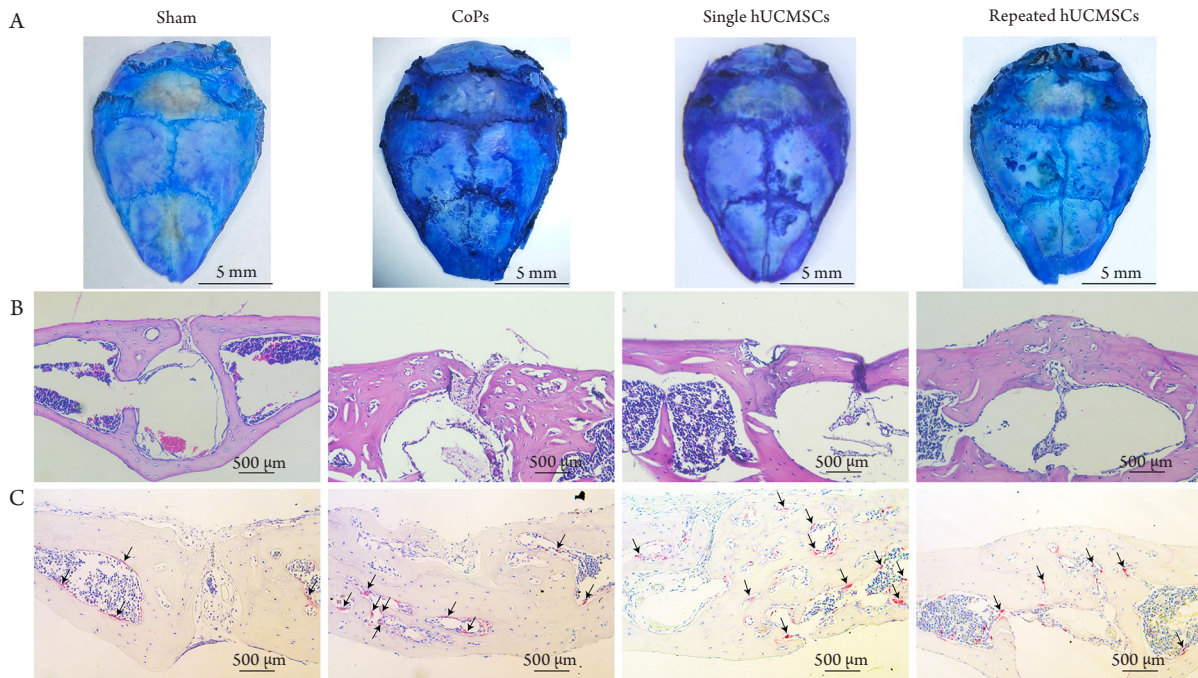


图6 小鼠颅骨溶解动物模型的组织学染色

Figure 6 Histologic staining of murine calvarial osteolysis animal model

(A) 甲苯胺蓝染色; (B) HE染色; (C) TRAP染色。

(A) Toluidine blue staining; (B) HE staining; (C) TRAP staining.

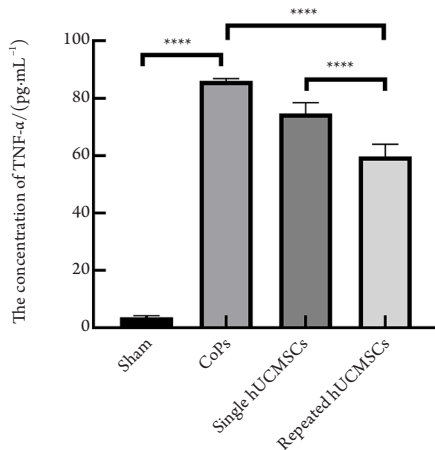


图7 ELISA法检测小鼠颅骨溶解动物模型中颅骨局部骨膜组织炎症因子水平(\*\*\*\* $P < 0.0001$ )

Figure 7 Inflammatory factor level of calvarial periosteum in murine calvarial osteolysis animal model detected by ELISA (\*\*\*\* $P < 0.0001$ )

### 3 讨论

本研究表明hUCMSCs通过抗炎活性在CoPs诱导小鼠颅骨溶解动物模型中起到保护作用。通过Micro-CT扫描和三维重建数据分析得知：相较

于单次hUCMSCs注射治疗，多次hUCMSCs注射治疗能明显增加小鼠颅骨的相关指标，如BMD和BV/TV。小鼠颅骨的组织学特征方面，在多次hUCMSCs注射治疗CoPs诱导小鼠颅骨溶解动物模型的颅骨样本中，相较于模型组和单次hUCMSCs注射组，HE染色和TRAP染色结果显示骨溶解程度明显降低和活化的破骨细胞减少。在多次hUCMSCs注射治疗CoPs诱导小鼠颅骨溶解的小鼠颅骨局部骨膜，结果显示：TNF- $\alpha$ 的表达水平相较于模型组和单次hUCMSCs注射组的均有明显降低，这表明了多次hUCMSCs注射在影响CoPs诱导小鼠颅骨溶解动物模型具有抗炎活性。

目前THA已成为治疗严重的髓关节退行性病变(OA、RA)或髓关节创伤骨折的金标准，但它可能伴有多种并发症，而无菌性松动是最常见的晚期并发症。目前对于无菌性松动的前期研究多集中在体内产生的磨损微粒与假体周围的多种细胞之间的相互作用上。微粒的产生是假体和骨骼之间的不断摩擦的结果<sup>[20]</sup>。本研究探讨了hUCMSCs是否对CoPs诱导的无菌性松动存在潜在治疗作用。本团队前期的研究<sup>[19,21]</sup>探讨了不同来源的微粒对于构建骨溶解动物模型的差异，发现使用无菌性松动患者假体制备的磨损微粒来诱导小鼠颅



骨溶解的动物模型构建是最有效的方案。而无菌性松动患者假体产生的颗粒与商业假体的相比成分更复杂。因此, 深入了解患者体内诱导无菌性松动的金属磨损颗粒的理化性质对探讨无菌性松动的病理生理机制至关重要, 也是本研究的必要条件。研究<sup>[22]</sup>表明: 成骨细胞的增殖率明显随着接触的Co和Cr离子水平增加而降低, 金属离子(Ti、Al、V、Co、Cr和Mo)能显著诱导成骨细胞存活率下调、早期凋亡率升高以及骨吸收介质, IL-6、IL-8和核因子κB受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor-κB ligand, RANKL)的表达上调<sup>[23]</sup>。XRD作为分析物体晶体学特征的一种仪器, 可以利用它对CoPs的物相成分进行定性分析。根据布拉格方程<sup>[24]</sup>( $d = \frac{\lambda}{2\sin\theta}$ ), CoPs通过XRD得到样本数据通过与国际衍射数据中心(International Centre for Diffraction Data, ICDD)PDF-2数据库进行匹配分析, 可以得到CoPs的主要组成成分。ICDD PDF-2数据库可提供化合物的名称、相对密度、化学公式、晶体系分类和相匹配的参考文件<sup>[25]</sup>。

MSCs作为结缔组织细胞的前体细胞, 是拥有多能分化潜能的干细胞, 具有增殖和自我更新能力, 可分化为成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞多种谱系。在骨重建和骨折愈合的过程中, MSC的迁移和分化是两个重要的生理过程。研究<sup>[26]</sup>表明: 人为控制MSCs的迁移方向可以重建骨组织结构, 从而在骨再生过程中实现合适的骨组织形成。MSCs参与全关节置换术后长期并发症无菌性松动的发生、发展<sup>[27]</sup>, 而有研究<sup>[28]</sup>表明以MSCs为靶向的治疗能较为有效地限制慢性炎症诱导的骨溶解, 淫羊藿素(Icariin)通过激活Wnt/β-catenin信号通路, 减弱Ti颗粒对MSCs成骨分化能力的抑制作用, 抑菌肽(LI37)与骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)基因修饰后的MSCs结合能通过促进MSCs的分化成熟和增殖, 改善慢性炎症诱导的骨溶解<sup>[29]</sup>。hUCMSCs作为MSCs的一种, 其调节炎症的能力有助于修复软骨, 减轻OA的进展, 且相对于单纯的hUCMSCs关节腔内注射, 诱导miR-140-5p过表达的hUCMSCs关节腔内注射能更加明显地促进软骨修复, 对于OA的治疗效果更加明显<sup>[30]</sup>。然而, 有学者<sup>[31]</sup>在探究hUCMSCs注射治疗对OA大鼠动物模型的影响中发现: 单次的hUCMSCs注射治疗仅起到延缓软骨蜕变进程的临时作用, 并不能抑制和逆转OA的长期进展。MSCs作为一类免疫缺陷细胞, 在关于

hUCMSCs在跨种属的动物实验<sup>[32-33]</sup>中, hUCMSCs移植入BALB/c系和C57BL/J6系小鼠体内能存在较长时间, 并不引起宿主的免疫反应, 并会迅速聚集到炎症或损伤部位。同样在本研究中, 影像学和组织学的结果显示多次hUCMSCs注射组相较于单次hUCMSCs注射组, 能更加明显地缓解CoPs诱导小鼠颅骨溶解的程度。

在骨折愈合的骨再生过程中, 骨折端的血肿机化期主要是由中性粒细胞和巨噬细胞组成的免疫细胞浸润, 而巨噬细胞可以通过自身分泌产生的信号分子, 如前列腺素E2 (prostaglandin E2, PGE2)、抑癌蛋白M和骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2, BMP2), 来影响巨噬细胞促进MSCs的聚集, 调节MSCs的分化的功能<sup>[12]</sup>。在金属磨损微粒诱导的无菌性松动中, 巨噬细胞被认为是磨损颗粒的重要靶点, 磨损微粒可诱导巨噬细胞的增殖、分化和活化<sup>[34]</sup>。活化的巨噬细胞可分泌TNF-α、IL-1α、IL-1β、IL-6、IL-8等一系列炎症因子, 诱导破骨细胞分化成熟或促进成骨细胞凋亡, 导致假体周围的骨吸收增强, 最终导致局部骨溶解和无菌性松动的发生<sup>[35]</sup>。hUCMSCs作为MSCs的来源之一, 也具有免疫调节和抗炎活性, 这是通过旁分泌因子或hUCMSCs与巨噬细胞之间的相互作用介导的。巨噬细胞作为一种具有可塑性和多能性的细胞, 根据活化状态可以分为2种形态, 即通过干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激激活的经典活化的巨噬细胞(M1型), 以及替代性活化的巨噬细胞(M2型)<sup>[36]</sup>。研究<sup>[37-38]</sup>表明: hUCMSCs分泌的外泌体或细胞外基质可抑制M1型的增殖, 并且有效激发巨噬细胞从M1型向M2型极化, 并通过下调TNF-α、MIP-1α(macrophage inflammatory protein-1α)、IL-6、IFN-γ等炎症因子或趋化因子抑制炎症反应。使用TNF-α预处理hUCMSCs后分泌得到的外泌体, 可通过抑制巨噬细胞中NLRP3炎症小体(NOD-like receptor protein 3)的激活, 从而减轻急性肝衰竭的炎症损伤。hUCMSCs分泌的外泌体除了与巨噬细胞相互作用影响和调解巨噬细胞功能和炎症因子的释放, 还能通过影响宿主本身的BMMSCs的分化潜能, 并通过miR-1263/Mob1/Hippo信号通路来抑制BMMSCs的凋亡, 从而达到对骨质疏松的治疗效果<sup>[39]</sup>。本研究TRAP染色结果显示: 多次hUCMSCs注射组与单次hUCMSCs注射组相比, 可以显著减少活化的破骨细胞数量; 同时各组颅骨局部骨膜组织的ELISA结果显示多次hUCMSCs注射组的TNF-α的表达水平明显低于

单次hUCMSCs注射组和模型组,表明hUCMSCs在CoPs诱导小鼠颅骨溶解动物模型中能通过抑制局部的炎症反应,从而抑制破骨细胞的活化。在本研究中,相比于单次hUCMSCs注射,多次hUCMSCs的注射等同于在CoPs诱导的骨溶解的过程中进一步增加了hUCMSCs的迁移数量,同时也提高了hUCMSCs的抗炎能力,颅骨表面骨膜组织的TNF- $\alpha$ 的表达进一步降低,诱导破骨细胞激活能力降低,骨吸收减少,从而导致骨溶解现象减少。

综上所述,无菌性松动是THA最常见的晚期并发症,探索一种安全有效的治疗和预防骨溶解的方法迫在眉睫。hUCMSCs作为MSCs的来源之一,在CoPs诱导的小鼠颅骨溶解动物模型中发挥保护作用。调节小鼠颅骨骨膜组织炎症反应可能是hUCMSCs治疗磨损颗粒诱导的骨溶解的调节机制。无论是hUCMSCs的外泌体具有抗炎作用还是其改善宿主本身的MSCs的成骨分化功能并抑制MSCs的凋亡,hUCMSCs对磨损颗粒引起的无菌性松动的影 响和其潜在的干预机制都有待我们从多种角度进一步研究,为未来可能的临床治疗提供一定的理论依据。

## 参考文献

- Varnum C. Outcomes of different bearings in total hip arthroplasty - implant survival, revision causes, and patient-reported outcome[J]. *Dan Med J*, 2017, 64(3): B5350.
- Veronesi F, Tschon M, Fini M. Gene expression in osteolysis: review on the identification of altered molecular pathways in preclinical and clinical studies[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3): 499.
- Purdue PE, Koulouvaris P, Potter HG, et al. The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2007, 454: 251-261.
- Ulrich SD, Seyler TM, Bennett D, et al. Total hip arthroplasties: what are the reasons for revision?[J]. *Int Orthop*, 2008, 32(5): 597-604.
- Dyskova T, Gallo J, Kriegova E. The role of the chemokine system in tissue response to prosthetic by-products leading to periprosthetic osteolysis and aseptic loosening[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1026.
- Su P, Tian Y, Yang C, et al. Mesenchymal stem cell migration during bone formation and bone diseases therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8): 2343.
- Confalonieri D, Schwab A, Walles H, et al. Advanced therapy medicinal products: a guide for bone marrow-derived MSC application in bone and cartilage tissue engineering[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2018, 24(2): 155-169.
- Lin H, Sohn J, Shen H, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing[J]. *Biomaterials*, 2019, 203: 96-110.
- Ribeiro A, Laranjeira P, Mendes S, et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(5): 125.
- Hendrijantini N, Hartono P. Phenotype characteristics and osteogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from amnion membrane (HAMSCs) and umbilical cord (HUCMSCs)[J]. *Acta Inform Med*, 2019, 27(2): 72-77.
- Zhang R, Ma J, Han J, et al. Mesenchymal stem cell related therapies for cartilage lesions and osteoarthritis[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(10): 6275-6289.
- Pajarinen J, Lin T, Gibon E, et al. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing[J]. *Biomaterials*, 2019, 196: 80-89.
- Ding DC, Chang YH, Shyu WC, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy[J]. *Cell Transplant*, 2015, 24(3): 339-347.
- Abbaszadeh H, Ghorbani F, Derakhshani M, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: A novel therapeutic paradigm[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(2): 706-717.
- Hendrijantini N, Hartono P, Ari MDA, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem-cell therapy to increase the density of osteoporotic mandibular bone[J]. *Eur J Dent*, 2019, 13(1): 58-63.
- Liang M, Liu W, Peng Z, et al. The therapeutic effect of secretome from human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in age-related osteoporosis[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 1357-1366.
- Wang L, Zhao L, Detamore MS. Human umbilical cord mesenchymal stromal cells in a sandwich approach for osteochondral tissue engineering[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2011, 5(9): 712-721.
- Zhao L, Weir MD, Xu HH. Human umbilical cord stem cell encapsulation in calcium phosphate scaffolds for bone engineering[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(14): 3848-3857.
- Deng Z, Wang S, Li M, et al. A modified murine calvarial osteolysis model exposed to Ti particles in aseptic loosening[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 3403489.
- Gu Q, Shi Q, Yang H. The role of TLR and chemokine in wear particle-induced aseptic loosening[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 596870.
- Ma T, Huang Z, Ren PG, et al. An in vivo murine model of continuous intramedullary infusion of polyethylene particles[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(27): 3738-3742.
- Mabilleau G, Kwon YM, Pandit H, et al. Metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty: a review of periprosthetic biological reactions[J]. *Acta*

- Orthop, 2008, 79(6): 734-747.
23. Alrabeah GO, Brett P, Knowles JC, et al. The effect of metal ions released from different dental implant-abutment couples on osteoblast function and secretion of bone resorbing mediators[J]. J Dent, 2017, 66: 91-101.
  24. Zhihua L, Xue Z, Xiaowei H, et al. Hypha-templated synthesis of carbon/ZnO microfiber for dopamine sensing in pork[J]. Food Chem, 2021, 335: 127646.
  25. Ravines P, Nazarenko AY. Characterizing the image forming particles of modern ungilded daguerreotypes using XRD and SEM[J]. Microsc Microanal, 2019, 25(4): 1037-1051.
  26. Ozasa R, Matsugaki A, Isobe Y, et al. Construction of human induced pluripotent stem cell-derived oriented bone matrix microstructure by using in vitro engineered anisotropic culture model[J]. J Biomed Mater Res A, 2018, 106(2): 360-369.
  27. Pajarinen J, Lin TH, Nabeshima A, et al. Mesenchymal stem cells in the aseptic loosening of total joint replacements[J]. J Biomed Mater Res A, 2017, 105(4): 1195-1207.
  28. Wang J, Tao Y, Ping Z, et al. Icarin attenuates titanium-particle inhibition of bone formation by activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway in vivo and in vitro[J]. Sci Rep, 2016, 6: 23827.
  29. Liu Z, Yuan X, Liu M, et al. Antimicrobial peptide combined with BMP2-modified mesenchymal stem cells promotes calvarial repair in an osteolytic model[J]. Mol Ther, 2018, 26(1): 199-207.
  30. Geng Y, Chen J, Alahdal M, et al. Intra-articular injection of hUC-MSCs expressing miR-140-5p induces cartilage self-repairing in the rat osteoarthritis[J]. J Bone Miner Metab, 2020, 38(3): 277-288.
  31. Xing D, Wu J, Wang B, et al. Intra-articular delivery of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells temporarily retard the progression of osteoarthritis in a rat model[J]. Int J Rheum Dis, 2020, 23(6): 778-787.
  32. Chang YL, Lo HY, Cheng SP, et al. Therapeutic effects of a single injection of human umbilical mesenchymal stem cells on acute and chronic colitis in mice[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 5832.
  33. 梁璐, 陈小军, 吴昊, 等. 人脐带间充质干细胞在小鼠体内的迁移变化及宿主的免疫反应[J]. 郑州大学学报(医学版), 2010, 45(1): 33-36.  
LIANG Lu, CHEN Xiaojun, WU Hao, et al. Survival and homing of human umbilical cord mesenchymal stem cells in immunocompetent mice[J]. Journal Of Zhengzhou Univeristy. Medical Sciences, 2010, 45(1): 33-36.
  34. Purdue PE. Alternative macrophage activation in periprosthetic osteolysis[J]. Autoimmunity, 2008, 41(3): 212-217.
  35. Purdue PE, Koulouvaris P, Nestor BJ, et al. The central role of wear debris in periprosthetic osteolysis[J]. HSS J, 2006, 2(2): 102-113.
  36. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, et al. Macrophage activation and polarization[J]. Front Biosci, 2008, 13: 453-461.
  37. Deng M, Tan J, Hu C, et al. Modification of PLGA scaffold by MSC-derived extracellular matrix combats macrophage inflammation to initiate bone regeneration via TGF- $\beta$ -induced protein[J]. Adv Healthc Mater, 2020, 9(13): e2000353.
  38. Sun G, Li G, Li D, et al. hucMSC derived exosomes promote functional recovery in spinal cord injury mice via attenuating inflammation[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2018, 89: 194-204.
  39. Yang BC, Kuang MJ, Kang JY, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes act via the miR-1263/Mob1/Hippo signaling pathway to prevent apoptosis in disuse osteoporosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 524(4): 883-889.

本文引用: 王帅, 邓展涛, 马元琛, 郑秋坚. 脐带间充质干细胞对 CoCrMo 磨损微粒诱导的小鼠颅骨溶解的影响[J]. 临床与病理杂志, 2022, 42(1): 15-25. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.01.003

**Cite this article as:** WANG Shuai, DENG Zhantao, MA Yuanchen, ZHENG Qiuqian. Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells in CoCrMo wear particles-induced murine calvarial osteolysis[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2022, 42(1): 15-25. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.01.003