

· 老年人骨质疏松专栏 ·

骨质疏松与间充质干细胞

罗展鹏, 马远征

(解放军 309 医院骨科, 北京 100091)

【摘要】 骨髓间充质干细胞 (MSCs) 具有自我更新和多向分化潜能, 在成年人的骨骼中它主要分化为成骨细胞和脂肪细胞。随着年龄增长, MSCs 发生老化, 其细胞分化方向改变, 致使成骨细胞生成减少, 脂肪细胞生成增多, 这可能是骨质疏松 (OP) 的原因之一。通过移植健康的 MSCs 重建造骨能力, 将为 OP 的防治提供新的思路和方法。

【关键词】 间充质干细胞; 骨质疏松; 细胞移植

【中图分类号】 R681

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2011.00028

Osteoporosis and mesenchymal stem cells

LUO Zhanpeng, MA Yuanzheng

(Department of Orthopaedics, Chinese PLA 309th Hospital, Beijing 100091, China)

【Abstract】 Mesenchymal stem cells (MSCs), with high self-renewal capacity and multi-potentiality, are mainly differentiated into osteoblasts and adipocytes in adult bone marrow. With aging, MSCs senescence results in the differentiation shift: osteoblasts decline and adipocytes increase, which may account for the osteoporosis. The transplantation of healthy bone MSCs, which can rebuild osteogenesis ability, will provide a new idea for the prevention and treatment of osteoporosis.

【Key words】 mesenchymal stem cells; osteoporosis; cell transplantation

骨质疏松 (osteoporosis, OP) 是以骨量减少、骨组织显微结构发生退行性改变, 致使骨强度下降、脆性增加、骨折危险性增高的一种全身代谢性骨病。在临床上表现为腰背疼和病理性骨折, 主要发生在中老年人, 尤其是绝经后妇女中, 发生率高达 60% 以上。据世界卫生组织预测, 到 2050 年亚洲 65 岁以上老年人将达 9 亿, 全世界一半的髋部骨折将发生在亚洲^[1]。随着人均寿命延长, 越来越多的国家步入老龄化社会, OP 发病率增加所造成的社会负担日趋严重。而 OP 的发病机制, 至今尚不完全清楚^[2]。间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是骨髓内存在的一类非造血干细胞, 具有多向分化潜能, 已有大量实验证实 MSCs 可以分化为肌细胞、成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞等^[3]。有研究发现, OP 患者出现骨量减少的同时, 都伴随有骨髓中脂肪组织增多^[4]。因而, 骨质疏松的发生原因应该是 MSCs 成脂和成骨分化能力失衡, 进一步导致成骨能力减退, 骨量减少^[5]。本文拟对这方面的研究进行综述, 探讨 MSCs 在 OP 临床研究中的应用。

1 MSCs 和 OP

MSCs 在体外培养中具有很强的增殖能力, 从理论上讲, 他们可以无限增殖、生长, 但它们不是永生的。体外研究显示^[6], 人 MSCs 停止生长非常早, 细胞数量倍增为 40~50 倍。Wagner 等^[7]发现, 在体外培养 43~77 d (第 7~12 代), 人 MSCs 即显示形态衰老的改变, 主要表现为细胞克隆形成单位的数量减少, 细胞体积增大, 表达表面标记物减少, 最后停止分裂。许多研究显示, MSCs 的衰老与染色体端粒有密切关系^[8]。Baxter 等^[9]的研究证实, 成人 MSCs 每次细胞分裂都出现端粒的消蚀, 由于 MSCs 不具端粒酶活性, 因此将无法修复因细胞分裂造成的端粒丢失, 当端粒长度短至 10kb 时, 细胞就停止分裂。端粒酶不仅与 MSCs 细胞分裂与衰老有关, 而且与其成骨分化能力也有相关性。Shi 等^[10]的研究显示, 将端粒酶基因转染至 MSCs 可明显增强其分裂能力, 而且, 将这些转染细胞移植到免疫缺陷小鼠, 发现其成骨能力明显强于非转染细胞。

细胞衰老不仅会降低细胞的分裂能力,其多向分化潜能也随之受到影响。研究表明^[11],去卵巢 OP 大鼠 MSCs 的细胞增殖指数降低,成骨分化指标碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 及骨钙素表达量均明显低于正常大鼠,提示 OP 大鼠的 MSCs 增殖和成骨分化能力均降低。透射电镜下观察显示,OP 大鼠 MSCs 细胞核常染色质、胞质内细胞器明显减少,细胞表面突起物基本消失,有部分细胞还出现常染色质消失,胞内细胞器结构紊乱,细胞内出现大量空洞,疑似脂滴,细胞表面出现膜性凋亡小体,提示细胞状态差,有凋亡现象发生^[12]。Rodriguez 等^[13,14]发现 OP 患者 MSCs 生长率较对照组低,而且抵抗胰岛素样生长因子 的促分裂作用;构成细胞外基质成分的 型胶原表达量不足正常组的 50%,转化生长因子 β (transforming growth factor, TGF- β) 和 ALP 表达强度均明显下降,并且趋向成脂方向分化。

2 MSCs 和 OP 的治疗

2.1 MSCs 的免疫特性

MSCs 具有低免疫原性和免疫抑制作用^[15,16]。很多研究显示, MSCs 能表达 MHC- 类分子,不表达 MHC- , CD40, CD80, CD86, 也不表达共刺激分子 B7-1, B7-2, CD40L, 因而一般认为 MSCs 具有低免疫原性。Western blot 实验发现,在细胞的裂解产物中也存在少量 MHC- 类分子,但 MSCs 细胞膜上并不表达 MHC- 类分子,使得 MSCs 能逃脱 CD4⁺T 细胞的识别。在 IFN- γ 刺激下,通常可上调细胞的 MHC- 和 MHC- 分子表达, MSCs 在 IFN- γ 作用 48 h 后可以诱导 90% 的细胞膜上 MHC- 分子表达,但即使 IFN- γ 作用后, MSCs 依然表现为抑制混合淋巴细胞反应 (mixed lymphocyte reactions, MLR)。在 MLR 的初始阶段或在反应的第 3 天加入 MSCs 都能够显著的抑制 MLR, 并且 MSCs 对 T 淋巴细胞增殖反应的抑制作用与 MSCs 的来源无关。王黎明等^[17]采用脐带间充质干细胞静脉输注的方式,细胞数为 1×10^7 /人次,对 17 例类风湿关节炎患者进行疗效观察,治疗前后患者均无不适症状,血常规、肝、肾功能、血清免疫球蛋白及补体 C3、C4 的检测结果显示无显著变化。甚至,学者们发现即使 MSCs 分化成其他类型的细胞,也继续保留它的免疫调节作用^[16,18]。在他们的实验中,将 MSCs 在特定条件下分化为成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞,并没有发现这些已分化细胞表达 MHC- 类分子;添加 IFN- γ 刺激 48 h 后,仅仅只有 10% 的成骨分化

细胞表达 MHC- 类分子,而且其抑制 MLR 的能力得到了提高。因此,移植 MSCs 不需抑制机体的免疫反应,能耐受更大程度上的 HLA 配型不符的特点,是很好的细胞移植治疗的种子细胞。

2.2 MSCs 的可移植性

MSCs 能否有效地应用于临床首先必须解决的是细胞的归巢问题。MSCs 在骨骼中的移植方式主要分两类,一是局部髓腔直接注射,二是通过静脉输注。段小军等^[19]运用增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 标记日本大耳白兔 MSCs,将其通过耳缘静脉注入兔尺骨骨折模型中,而后在骨断端组织观察到 EGFP 阳性细胞,证实了静脉途径给予的 MSCs 可以迁移聚集到骨折区域的血肿组织内。Devine 等^[20]将 EGFP 标记的自体或异体 MSCs 连同自体造血细胞一同经静脉输入接受辐射损伤的灵长类动物体内,结果发现在 6 h 内就可在骨髓活检物中通过 PCR 检测到转入荧光基因的存在,移植后 1 年仍可在荧光显微镜下检测到带供体来源 MSCs 的定植,并且在整个实验过程没有发生急性或慢性的移植毒性反应。作者由此得出三个结论:(1)自体或异体 MSCs 静脉移植不引起急性或慢性移植毒性反应;(2)静脉移植的 MSCs 可以向骨髓组织归巢;(3)移植的 MSCs 可长期在骨髓腔中定植。Li 等^[21]将正常小鼠的 MSCs 经静脉注入经过放射线处理的成骨不全症幼鼠体内,4 周后在小鼠股骨、胫骨的骨髓、骨小梁和骨皮质中均找到有移植细胞存在,这些供体 MSCs 能分化增殖为成骨细胞,并表达 型胶原蛋白,参与合成胞外基质。这些实验表明,通过静脉输注 MSCs 可以成功植入骨及骨髓腔基质,并向成骨方向转化。

2.3 MSCs 移植在 OP 中的应用

2.3.1 原发性骨质疏松症 SAMP6 小鼠属快速老化模型小鼠 (senescence accelerated mouse, SAM) 的骨质疏松型,它是仅有的一种能证明增龄性骨质疏松性骨折的实验动物。SAMP6 以自然发生快速老化、短寿、老年性骨质疏松为特征。其骨质疏松的特点为 4~5 个月骨量达到峰值,然后随增龄其骨量降低,并有中老年的自发性骨折倾向。6 月龄 SAMP6 不仅骨量低,骨质疏松性显著增加,骨的显微结构也表现为骨小梁稀疏、细小,骨小梁间隙大,是研究老年性骨质疏松症的理想动物模型^[22,23]。

Ichioaka 等^[24]在 2002 年首次进行了骨髓移植治疗老年性骨质疏松的动物实验。他们抽取正常 B6

小鼠的骨髓间质细胞 (bone marrow cells, BMCs), 直接注射进经过照射预处理的 4 月龄 SAMP6 小鼠胫骨髓腔。与正常老化 SAMP6 小鼠相比, 12 月龄骨髓移植 SAMP6 小鼠 (即移植后 8 个月) 骨小梁明显增粗、增宽, 骨皮质厚度增加, 骨密度值保持正常水平, 尿液中脱氧吡啶啉 (urinary deoxypyridinoline, DPD) 含量明显减少。抽取小鼠骨髓细胞行原代培养, PCR 实验显示白介素 (interleukin, IL)-11、IL-6 含量保持正常。此后, 这个课题组在 2006 年和 2007 年陆续发表文章表明^[25,26], 针对 10 月龄 SAMP6 小鼠行髓腔内 BMCs 移植, 可以纠正骨密度、尿 DPD 含量, 改善骨显微结构, 并调整 MSCs IL-11、IL-6 和核因子 κ B 受体活化因子配基 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 的表达水平。更有趣的是, 作者将 2 月龄的 SAMP6 小鼠 BMCs 移植到同龄 B6 小鼠髓腔内, 10 个月后 B6 小鼠表现出了与同龄 SAMP6 小鼠同样的骨质疏松性改变, 即为骨小梁稀疏、细小, 骨小梁间隙大, 骨密度值降低, 尿 DPD 含量升高。抽取小鼠骨髓行原代培养, 免疫荧光染色提示 BMCs 皆属于供体来源, IL-11 和 IL-6 的表达水平明显下降, 继续分化为成骨细胞后免疫荧光染色依旧提示属于供体来源。作者得出结论, BMCs 髓腔内移植可以重建骨髓微环境, 改变骨代谢水平, 并由此推测干细胞功能失调可能是老年性骨质疏松最重要的发病机制。

去势 (ovariectomized, OVX) 雌性大鼠的卵巢被切除以后, 松质骨的骨量减少, 骨代谢活跃, 骨强度下降, 这种特性较好地模仿了人正常绝经时高转换型骨质疏松发生时的骨丢失状态, 是目前公认的研究绝经后骨质疏松症的最佳动物模型。Cho 等^[27,28]采取逆转录病毒介导的方法将 RANK-Fc 和 (或) 趋化因子受体 4 (C-X-C chemokine receptor-4, CXCR4) 整合到 MSCs 基因组内, 然后通过静脉移植到 OVX 大鼠体内, 结果发现, 单纯 MSCs 移植可以改善 OVX 大鼠的骨量丢失, 过表达 RANK-Fc 能通过抑制破骨细胞的生成进一步减少骨量丢失, 而过表达 CXCR4 能够促进 MSCs 向骨组织的迁移, 最大程度地抑制 OVX 大鼠的骨量丢失, 并且过表达 RANK-Fc 和 CXCR 具有协同作用。Lee 等^[29]还发现, 移植到 OVX 大鼠体内的 MSCs 能通过分泌多种细胞因子促进成骨细胞和破骨细胞的增殖和分化, 从而减少骨量的丢失。

2.3.2 继发性骨质疏松症 临床上引起继发性骨质疏松症的病因很多, 糖皮质激素性骨质疏松症 (glucocorticoid-

induced osteoporosis, GIOP) 在药物导致的骨质疏松症中最为常见, 糖皮质激素主要通过促进破骨细胞介导的骨吸收及抑制成骨细胞介导的骨形成引起骨质疏松。

Lien 等^[30]首次发现通过移植异体骨髓 MSCs 可以使 GIOP 小鼠的骨量和骨强度恢复至正常水平, 携带外源基因 CXCR4 能显著提高静脉移植的 MSCs 向骨组织的定向迁移。陶晖等^[31]使用醋酸泼尼松龙构建 GIOP 大鼠, 通过尾静脉移植脂肪源性 MSCs, 4 周后进行骨密度测量及胫骨骨组织形态计量分析发现, 腰椎及股骨的骨密度均明显增加, 破骨细胞数目减少, 骨吸收下降, 骨小梁的形成增多, 骨小梁变厚变粗, 骨小梁间的连接增加, 陷窝减少, 说明异体 MSCs 移植能够提高 GIOP 大鼠骨密度, 促进骨形成。

2.3.3 特发性骨质疏松症 成骨不全 (osteogenesis imperfecta, OI) 是由于成骨细胞分泌 I 型前胶原的基因缺陷, 临床上表现为骨脆性增加、骨量减少、骨发育缓慢、畸形的一种遗传病。目前针对 OI 的治疗药物主要是双膦酸盐, 通过抑制破骨细胞功能, 可以减轻骨痛, 增加骨密度, 减少骨折发生率^[32]。但这类药物不能从根本上改变 I 型胶原分泌与合成的基因缺陷, 其最佳疗效期位于生长期儿童用药的前 2~4 年, 其后疗效衰减, 不适合长期应用^[33,44]。近年来, 骨髓干细胞移植逐步成为 OI 治疗的热点^[21]。Horwitz 等^[35,36]应用含 MSCs 的同种异体骨髓移植治疗重度 OI 患儿, 取得了良好的效果。在移植后 3 个月, 所有患者骨矿物质含量增高 21~29g, 而同期对照组正常儿童骨矿物质增高量仅为 0~4g, 骨髓活检中显示骨小梁增粗、新密质骨形成, 其中 1.5%~2.0% 的 MSCs 属于供体来源。移植后 6 个月所用患者身高平均增加 7.5 cm, 同期正常对照组为 1.25 cm。但 6 个月后患者的生长速率开始变缓, 虽然骨矿物质增高量仍然与同龄正常儿童持平, 但患儿身高增长明显减慢。是否因为供体 MSCs 在患者体内失去了自我复制增殖和成骨分化能力, 导致了 MSCs 移植在 6 个月以后开始失效? 为了回答这个问题, Dominici 等^[37]陆续进行了一系列动物实验。他们为接受照射损伤的 FVB/N 小鼠进行 (green fluorescent protein, GFP) 标记的骨髓间质细胞移植, 8 周后抽取骨髓细胞进行流式细胞仪分析, 发现 GFP 阳性细胞的比例为 98%, 免疫组化结果显示, GFP 阳性的成骨细胞比例为 $(7.9 \pm 4.2)\%$ 。将富含 98%GFP 阳性细胞的骨髓间质再次移植到新的照射

损伤 FVB/N 小鼠体内, 3 周后采用同样方法检测显示, GFP 阳性细胞的比例为 84%, GFP 阳性的成骨细胞比例为 $(7.5 \pm 1.3)\%$ 。作者因此认为, 移植 MSCs 在受体体内具有长期的自我增殖和成骨分化能力, 但 OI 患者体内微环境可能存在某种机制, 抑制了 MSCs 的长期造骨能力。

3 展望

目前对 MSCs 及其成骨方面的研究虽已取得了一定的进展, 但该领域的研究尚处于探索阶段, 且多处于动物实验阶段, 在临床的应用较少, 以下问题有待解决: (1) 实验证明体外的 MSCs 均为各种细胞的混合物, 如何才能有效的获得纯的 MSCs, 有待于对 MSCs 的细胞学特点和分化各阶段细胞标志物的研究。(2) 即使是自体移植, MSCs 在分离培养扩增过程中会导致分泌细胞因子及合成表面受体的能力下降, 从而失去趋化、支持、营养等功能, 甚至失去干细胞特性。(3) 长期培养的干细胞具有潜在的致瘤性。MSCs 在体内增殖、分化的机制以及如何控制 MSCs 在体内按需求增殖、分化的条件尚不明了, 如何既能控制其过度增殖避免肿瘤的发生, 又能在适当的时候启动其沿所需的途径分化?(5) 此外, 如何提高移植的 MSCs 在体内的分化率和存活率并向目标区域迁移, 如何把握 MSCs 移植的合适时间和数量, 如何提高 MSCs 向成骨细胞的分化, 也是亟待解决的问题。但是, MSCs 移植已显示出传统方法所不可比拟的优势, 随着人们认识的不断深入, 该方法将有着广泛的临床应用前景。

【参考文献】

- [1] Cooper C, Campion G, Melton LJ 3rd. Hip fractures in the elderly: a world wide projection[J]. *Osteoporos Int*, 1992(6): 285-289.
- [2] Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future[J]. *Lancet*, 2011, 377(9773): 1276-1287.
- [3] Conger PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells[J]. *J Cell Physiol*, 1999, 181(1): 67-73.
- [4] Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, *et al*. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis[J]. *Biogerontology*, 2001, 2(3): 165-171.
- [5] Rosen CJ, Bouxsein ML. Mechanism of disease: Is osteoporosis the obesity of bone[J]? *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2006, 2(1): 35-43.
- [6] Stenderup K, Justesen J, Clausen C, *et al*. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells[J]. *Bone*, 2003, 33(6): 919-926.
- [7] Wagner W, Wein F, Seckinger A, *et al*. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood[J]. *Exp Hematol*, 2005, 33(11): 1402-1416.
- [8] Sharpless NE, Depinho RA. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer[J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(2): 160-168.
- [9] Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, *et al*. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following *in vitro* expansion[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(5): 657-682.
- [10] Shi S, Gronthos S, Chen S, *et al*. Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression[J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(6): 587-591.
- [11] 李冬菊, 葛冬霞, 吴文超, 等. 去卵巢骨质疏松小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化能力研究[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2005, 36(3): 318-321.
- [12] 杨丽, 张荣华, 蔡宇, 等. 去卵巢对 SD 大鼠 MSCs 生物学特性的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(7): 1249-1254.
- [13] Rodriguez JP, Montecinos L, Ríos S, *et al*. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation[J]. *J Cell Biochem*, 2000, 79(4): 557-565.
- [14] Rodriguez JP, Hess R. High affinity leptin receptors are present in human mesenchymal stem cells(MSCs) derived from control and osteoporotic donor[J]. *J Cell Biochem*, 2005, 94(1): 50-57.
- [15] Sotiropoulou PA, Papamichail M. Immune properties of mesenchymal stem cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 407(3): 225-243.
- [16] Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, *et al*. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells[J]. *Exp Hematol*, 2003, 31(10): 890-896.
- [17] 王黎明, 周建军. 脐带间充质干细胞治疗 17 例类风湿关节炎患者的临床疗效观察[J]. *中国免疫学杂志*, 2009, 26(7): 659-662.
- [18] Liu H, Kemeny DM, Heng BC, *et al*. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells[J]. *J Immunol*, 2006, 176(5): 2864-2871.
- [19] 段小军, 杨柳, 周跃, 等. 增强型绿色荧光蛋白标记技术对骨折后骨髓间充质干细胞的迁移示踪[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2006, 20(2): 102-106.
- [20] Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, *et al*. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion[J]. *Exp Hematol*, 2001, 29(2): 244-255.

- [21] Li F, Wang X, Niyibizi C. Distribution of single-cell expanded marrow derived progenitors in a developing mouse model of osteogenesis imperfecta following systemic transplantation[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(12): 3183-3193.
- [22] Kajkernova O, Lecka-Czernik B, Gubrij I, *et al.* Increased adipogenesis and myelopoiesis in the bone marrow of SAMP6, a murine model of defective osteoblastogenesis and low turnover osteopenia[J]. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(11): 1772-1779.
- [23] 张月峰, 韩景献. 骨质疏松动物模型研究进展[J]. *动物医学进展*, 2005, 26(3): 8-11.
- [24] Ichioka N, Inaba M, Kushida T, *et al.* Prevention of senile osteoporosis in SAMP6 mice by intrabone marrow injection of allogeneic bone marrow cells[J]. *Stem Cells*, 2002, 20(6): 542-551.
- [25] Takada K, Inaba M, Ichioka N, *et al.* Treatment of senile osteoporosis in SAMP6 mice by intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(2): 399-405.
- [26] Ueda Y, Inaba M, Takada K, *et al.* Induction of senile osteoporosis in normal mice by intra-bone marrow-bone marrow transplantation from osteoporosis-prone mice[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(6): 1356-1363.
- [27] Cho SW, Sun HJ, Yang JY, *et al.* Transplantation of mesenchymal stem cells overexpressing RANK-Fc or CXCR4 prevents bone loss in ovariectomized mice[J]. *Mol Ther*, 2009, 17(11): 1979-1987.
- [28] Kim D, Cho SW, Her SJ, *et al.* Retrovirus-mediated gene transfer of receptor activator of nuclear factor-kappaB-Fc prevents bone loss in ovariectomized mice[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(7): 1798-1805.
- [29] Lee K, Kim H, Kim JM, *et al.* Systemic transplantation of human adipose-derived stem cells stimulates bone repair by promoting osteoblast and osteoclast function[J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(10): 2082-2094.
- [30] Lien CY, Chih-Yuan Ho K, Lee OK, *et al.* Restoration of bone mass and strength in glucocorticoid-treated mice by systemic transplantation of CXCR4 and cbfa-1 co-expressing mesenchymal stem cells[J]. *J Bone Miner Res*, 2009, 24(5): 837-848.
- [31] 陶 晖, 余美春, 杨会营, 等. 脂肪源干细胞移植对糖皮质激素性骨质疏松骨量影响的实验研究[J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(5): 817-821.
- [32] Seikaly MG, Kopanati S, Salhab N, *et al.* Impact of alendronate on quality of life in children with osteogenesis imperfecta[J]. *J Pediatr Orthop*, 2005, 25(6): 786-791.
- [33] Vallo A, Rodriguez-Leyva F, Rodríguez Soriano J. Osteogenesis imperfecta: anthropometric, skeletal and mineral metabolic effects of long-term intravenous pamidronate therapy[J]. *Acta Paediatr*, 2006, 95(3): 332-339.
- [34] Rauch F, Travers R, Glorieux FH. Pamidronate in children with osteogenesis imperfecta: histomorphometric effects of long-term therapy[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(2): 511-516.
- [35] Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, *et al.* Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta[J]. *Nat Med*, 1999, 5(3): 309-313.
- [36] Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, *et al.* Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta[J]. *Blood*, 2001, 97(5): 1227-1231.
- [37] Dominici M, Marino R, Rasini V, *et al.* Donor cell derived osteopoiesis originates from a self-renewing stem cell with a limited regenerative contribution after transplantation[J]. *Blood*, 2008, 111(8): 4386-4391.

(编辑: 任开环)