

骨髓多能干细胞动脉灌注治疗股骨头坏死的实验研究

季卫锋¹ 童培建¹ 郑文标² 厉 驹¹ 肖鲁伟¹

摘要 目的 探讨骨髓多能干细胞动脉灌注治疗股骨头坏死的疗效和机理研究。方法 利用 Shwartzman 反应加大剂量甲基强的松龙造成兔股骨头坏死模型,造模成功后在兔股骨抽取骨髓,进行体外分离培养骨髓多能干细胞,使之大量增殖。兔随机分为 4 组:对照组(注射生理盐水)、丹参组(注射丹参和尿激酶)、干细胞组(注射骨髓多能干细胞)、综合组(注射骨髓多能干细胞、丹参和尿激酶),于治疗后的 2、4 周分批处死动物后进行各种指标检测,包括 X 线钼靶摄影、常规 HE 染色切片、四环素标记荧光显微镜观察、电镜扫描超微结构观察。结果 兔造模成功后出现股骨头坏死表现,高选择性旋股内、外动脉插管药物治疗后 2、4 周, X 线表现骨质密度改变明显好转。病理组织学表现空骨陷窝减少,成骨细胞增多,新骨形成。四环素荧光标记显示坏死修复区荧光带鲜亮,边界增宽。电镜扫描下可见坏死区纤维组织杂乱,成骨细胞内细胞器丰富,空骨陷窝减少。经多能干细胞动脉灌注治疗后显示在时间和效果方面更优越。结论 高选择性股动脉灌注药物治疗股骨头坏死能加速兔股骨头的再血管化和再骨化进程。骨髓多能干细胞比丹参显效时间更快捷,疗效更显著。

关键词 股骨头坏死;多能干细胞;动脉灌注;骨生成

Experimental Study on Treatment of Femoral Head Necrosis with Arterial Perfusion of Marrow Stem Cells

Ji Wei-feng, Tong Pei-jian, Zheng Wen-biao, et al *Department of Orthopaedics, Zhejiang Provincial Hospital of TCM, Hangzhou (310006)*

Objective To explore the effect of arterial perfusion of marrow multifunctional stem cells (MFSC) in treating femoral head necrosis and its mechanism. **Methods** The rabbit model of femoral head necrosis was established by large dose of methyl-prednisone through Shwartzman response. Bone marrow was extracted from femoral bone of model rabbit and isolated *in vitro* for culturing and proliferating MFSC. The experimental rabbits were randomly divided into 4 groups, treated with normal saline (A), Salvia + urokinase (B), MFSC (C) and MFSC + Salvia + urokinase (D), respectively, they were sacrificed in batches at 2 and 4 weeks after treatment, and changes in various parameters, including molybdenum target roentgenogram, routine pathology with HE staining, tetracycline labeled fluorescent microscopy and ultrastructure alteration by scanning electron microscope (SEM), were observed. **Results** Typical appearance of femoral head necrosis was shown in the successfully modeled rabbits. Two and 4 weeks after treatment by high selective drug via medial and lateral femoral circumflex arterial perfusion, the X-ray examination showed significant improvement of bone density; pathohistologic manifestation showed decrease of empty bone lacuna, increase of osteoblast and new bone formation; tetracycline fluorescent labeled microscopic picture showed bright fluorescent band of increased osteoblasts in necrosis repairing region with widened border; SEM displayed irregularly arranged fibrosis in necrosis region, abundant organelles in osteoblasts with few empty bone lacuna. The above-mentioned improvement was more significant in rabbits treated by MFSC. **Conclusion** High selective femoral drug arterial perfusion in treating femoral head necrosis could accelerate the process of revascularization and re-ossification in rabbits. As compared with Salvia, MFSC showed quicker and more potent effect.

Key words femoral head necrosis; multifunctional stem cell; arterial perfusion; osteogenesis

基金项目:国家中医药管理局重点课题(No. 97A205)

作者单位:1. 浙江中医学院附属医院骨伤科(杭州 310006);2. 浙江省台州市立医院骨科

通讯作者:季卫锋;Tel:13777865005;E-mail:jiweifeng@zjctcm.net

目前有关股骨头坏死的发病机制的学说有许多,如脂肪栓塞学说、骨细胞脂肪变性学说、骨内高压及静

脉淤滞学说、微血管损伤学说等,但最终机制尚不明确^[1],手术治疗效果虽较满意,但创伤大,费用高,并发症多,而保守治疗有效率很低。随着干细胞工程与组织学工程的进展,骨髓多能干细胞,又称骨髓基质干细胞(marrow stem cells, MSC)的理论与应用研究越来越受到重视。本实验对家兔股骨头坏死模型高选择性股动脉灌注骨髓多能干细胞,通过观察其疗效,探讨骨髓多能干细胞动脉灌注治疗股骨头坏死的部分机理。

材料与方法

1 药物与试剂 甲基泼尼松:美国普强药厂比利时分厂产品(LOG/MFG/EXP:ECO17:031 1997、03/2002);注射用尿激酶:广东天普生物化学制药有限公司产品;丹参注射液(每毫升含丹参 1.5g):正大青春宝药业有限公司生产。

2 动物及模型的制备 健康成年 20~26 周龄的纯种新西兰大白兔 50 只,雄性,体重(2.5±0.25)kg,由浙江省医学科学院实验动物中心提供。模型制作按文献^[2]方法,即兔静脉注射 50μg/kg 大肠杆菌内毒素(LPS),24h 后重复,在第二次注射 LPS 后,臀肌注射甲基强的松龙 20mg/kg,3 次,每次间隔 24h,造模期前 3 天,肌肉注射青霉素 40 万 U/只,此后每周两次肌肉注射青霉素 40 万 U/只,抽取骨髓及动脉灌注治疗手术后 3 天亦肌肉注射青霉素 40 万 U/只。

3 MSC 的体外培养与增殖 从兔股骨下端松质骨处穿刺抽取 1.0~1.5ml 骨髓置入 10ml 离心管,加入 PBS 溶液,以 500r/min 离心 5min,弃上清液,留底部沉淀部分,再加入 PBS,如上述离心数次,尔后加入含 20% FCS 的 DMEM/F12,6~8ml 转移至培养瓶中,于 5% CO₂ 37℃ 孵箱中培养,每 3 天换药 1 次,每天在倒置显微镜下进行动态观察细胞形态及细胞生长速度。第 15 天,以 0.25% /0.02% /Try Psin/EDTA 4~6ml 强化数分钟,弃去消化液,加入 PBS,吹打成单细胞悬液,备用。

4 动物分组与给药 造模成功后兔随机分为 4 组(每组 12 只):即(1)干细胞组:数字减影血管造影术(DSA)介入下旋股内、外动脉插管,注射 MSC 0.5ml/只。(2)丹参组:DSA 介入下旋股内、外动脉插管,注射尿激酶 1 万 U/只和丹参注射液 2ml/只;(3)综合组:DSA 介入下旋股内、外动脉插管,注射尿激酶 1 万 U/只加丹参注射液 2ml/只加 MSC 0.5ml/只;(4)对照组:DSA 介入下旋股内、外动脉插管注射 2ml 生理盐水。治疗后的 2 周、4 周分批处死,进行各种指标观

察与检测。

5 观察指标与检测方法

5.1 一般大体观察 动物毛发光泽度、食量、大小便、活动度、步态、精神状况。

5.2 放射科摄片观察 动物处死后,取出股骨头,急送钼靶摄影(意大利慧人公司生产),观察骨质密度改变,骨质疏松情况,囊性变或硬化,股骨头皮质下新月状透亮影(新月征),内部裂隙样透亮线,股骨头轮廓改变。

5.3 组织病理学检测 取双侧股骨头,沿中心冠状面剖成两半,置于 10% 甲醛溶液中固定 1 周,经 EDTA-2Na(pH7.4)脱钙 2 个月,脱钙后进行常规 HE 染色。二甲苯透明后石蜡包埋,HE 染色切片计数软骨下骨小梁空骨陷窝数。在 400 倍高倍镜下,计数 30 个骨细胞空骨陷窝阳性数。

5.4 四环素荧光标记 取材前 1 周,每天给予四环素片 2 片,连续灌胃 3 天,取材后用无水酒精固定,环氧树脂 812 包埋,德国莱兹公司 K 型硬组织切片机切成 30μm 的薄片,Olympus 荧光显微镜观察测量荧光带宽度及亮度。

5.5 电镜观察 4% 戊二醛前固定 3 个月,环氧树脂包埋,日立 600 型透射电镜观察骨细胞改变,包括骨细胞形态,胞浆、胞核、细胞器等。

6 统计学方法 采用 t 检验。

结 果

1 动物造模后一般大体观察 注射大肠杆菌内毒素第 1 天动物均出现精神异常,烦躁或萎靡、睡眠减少、食量锐减、大便不成形、反应迟钝、活动少、呼吸急促、毛发蓬松;1 周后动物食量增加,大小便好转,活动增加;3 周后 50% 动物均出现不喜行动,走路姿势呈“跛脚”状。给予动脉灌注治疗后大多数动物活动度均有所增加,走路姿势逐步好转。

2 X 线表现 用药后 2、4 周分别每组处死 6 只动物摄片,如果无骨质疏松、密度不均、囊性变、新月征、裂隙征等 X 线改变,即称阳性反应(即治疗后好转,见表 1)。

表 1 4 组动物在用药后不同时期 X 线阳性反应比较 (只)

组别	动物数	阳性反应		合计
		2 周	4 周	
干细胞	12	3	6	9*
丹参	12	2	4	6*
综合	12	4	6	10*
对照	12	0	1	1

注:与对照组比较,* P<0.05

3 组织病理学观察 肉眼观察:综合组股骨头外形、轮廓正常,正中切开呈淡黄色,骨质无缺损。HE 染色:对照组术后 2 周及 4 周,病理切片上呈典型的骨坏死,坏死区域位于股骨头靠近股骨的松质骨内,交界处有大量间充质细胞增生,髓腔中充满坏死的组织碎片,骨小梁坏死,骨陷窝空缺或骨细胞核固缩,同时伴有中性粒细胞的聚集,严重者出现骨小梁的断裂(图略);干细胞组治疗后 2 周,可见空骨陷窝减少(见表 2),毛细血管增生明显,坏死骨小梁表面成骨细胞明显增多,散在破骨细胞伪足出现,骨小梁表面有新骨形成(图略)。治疗 4 周时,空骨陷窝细胞减少明显及成骨细胞数量明显增多,功能活跃,新骨增多(图略)。综合组表现与之相似,而丹参组则部分有此表现(见表 2)。

表 2 4 组动物不同时空骨陷窝率测定结果比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	空骨陷窝率	
		2 周	4 周
干细胞	6	8.90 ± 1.90 *	6.20 ± 2.23 *
丹参	6	15.37 ± 2.83	11.30 ± 2.30
综合	6	8.16 ± 1.75 *	5.70 ± 1.97 *
对照	6	19.25 ± 3.50	18.96 ± 3.65

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

4 四环素荧光标记结果 四环素结晶可以在血液循环中与骨小梁上的钙离子结合而成的螯合物,在荧光显微镜下观察到骨小梁周围的荧光带。对照组坏死区边缘骨小梁周围荧光带狭细、浅淡或无荧光带;而综合组、干细胞组、丹参组均可见坏死区边缘及修复区荧光带鲜亮,边界增宽,2 周及 4 周表现相似,干细胞组四环素荧光反应很明显,综合组效果相似,但丹参组荧光反应相对较弱。如果设定荧光带狭细浅淡或无荧光带为 0 级,荧光带鲜亮、边界增宽为 2 级,介于二者之间为 1 级(见表 3)。

表 3 四环素标记荧光强度比较 (只)

组别	动物数	0 级	1 级	2 级
干细胞	12	0	2	10 *
丹参	12	1	4	7 *
综合	12	0	1	11 *
对照	12	10	2	0

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

5 电镜观察结果 对照组扫描电镜下可见坏死区杂乱的纤维组织,空缺陷窝,大量絮状物质,无血管存在,残余骨细胞,形态不规则状为多,细胞器稀少,核模不完整(见图 1);干细胞组及综合组在透射电镜下修复区形成骨细胞多角形,核模完整清晰,线粒体、粗面内质网等细胞器丰富(见图 2);丹参组在透射电镜下修复区的成骨细胞呈多角形,核模完整,可见线粒体、粗面内质网等细胞器(图略)。

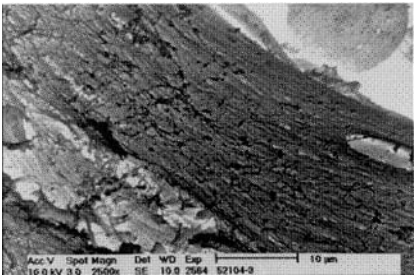


图 1 对照组扫描电镜下可见坏死区杂乱的纤维组织,空缺陷窝,大量絮状物质,无血管存在,残余骨细胞,形态不规则状为多,细胞器稀少,核模不完整

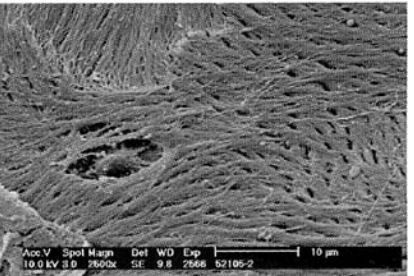


图 2 干细胞组和综合组透射电镜下可见修复区形成骨细胞多角形,核模完整清晰,线粒体、粗面内质网等细胞器丰富

讨 论

股骨头坏死是常见病、多发病,是一种对髋关节具有特殊破坏性的退行性病变。脂肪栓塞学说、骨内高压和静脉淤滞学说、微血管损伤学说、骨质疏松学说是股骨头坏死广为接受的学说,这些学说的共同点是骨细胞的缺血,即血液供应的减少。尽管股骨头坏死学说众多,但股骨头血液循环障碍是公认的病机^[3]。因此治疗股骨头坏死,首先要改变血液的高凝和淤滞状态,疏通股骨头局部微循环,促进内皮的修复和血管的生长,从而促进股骨头的修复和再骨化。血管内皮有合成和释放前列腺素,破坏 ADP,参与蛋白 C 的激活,分泌 AT-III 和 t-PA 纤溶的功能,能有效预防血栓的形成^[4];同时微血管内皮细胞是间充质来源,和骨髓紧密相连,与骨髓细胞具有基因抗原,因而被认为有可能直接分化为成骨细胞和生血细胞,而参与成骨^[5]。近年来的研究证明,血管内皮细胞能直接分化为成骨细胞而参与成骨活动^[6]。同时血管内皮细胞尚能通过旁分泌和自分泌,FGF1、IL-1、IL-6、VEGF 等具有成骨活性的调节物质,促进骨的发育^[7]。故本实验采用动脉灌注发挥以下几个方面作用:(1)疏通发生病变的股骨头内血管,改善静脉回流,降低骨内压,恢复或改善股骨头

的血供。本实验模型仅有股骨头的缺血改变,局部各组织代谢异常,但未发现骨组织根本坏死。因此,本期采用动脉灌注治疗的疗效确切。(2)改善或增加股骨头坏死区域周围及髋部各组织的血液循环,为股骨头坏死区域提供良好血供的局部环境。髋部血管网络非常丰富,髂内、外血管及支配股骨头血供的主要血管间有大量吻合支。(3)保护局部血管内皮,促进血管内皮细胞修复、再生及血管增生的作用。动脉药物灌注不仅通过解痉、溶栓、抗凝作用来保护血管内皮,而且可以促进血管内皮细胞的修复、再生及促进血管增生的作用。研究得出各项结果亦证实上述组织学改变。

关于股骨头坏死的动物模型,在早期,国内外学者通常单纯应用糖皮质激素,如甲基强的松龙、氢化泼尼松龙诱发动物发生股骨头坏死,但结果建立的模型均不理想^[8]。因激素造成的骨坏死者多有各种不同潜在性高敏状态,并且造模成功的时间不能明确。而本研究采用细菌内毒素结合激素建立兔骨坏死模型,因为内毒素致施区茨曼反应(Shwartzman reaction)通过激活血管内淤血,引起骨坏死,而激素适度抑制网状内皮系统和内皮细胞的纤溶活性加强血浆高凝和低纤溶状态,进一步诱导骨坏死,这与人类骨坏死的病因和早期病理变化很相似。

近年来,干细胞工程技术的兴起和发展为本研究课题提供了理论基础依据。骨髓多能干细胞是骨髓的一种间充质细胞,来源于中胚层,具有多向分化潜能,在特定的理化条件与细胞因子的诱导下,可定向地向成骨细胞方向分化,形成骨细胞^[9-11]。Owen 等经过对骨髓基质的研究,提出了骨髓基质细胞学说,认为骨髓中存在多能干细胞,亦有人称为基质干细胞在一定条件下能为分化为纤维细胞、网状细胞、脂肪细胞和成骨系列细胞,它们有共同的祖系^[12],并且在一定的条件下可以相互转化。高选择性动脉灌注后,多能干细胞在股骨头局部聚积,在不同理化环境中活性蛋白多肽的诱导下,基质干细胞可定向地向成骨细胞系转化,破骨细胞亦大量被激活,这种细胞在正常的生理情况下并不活跃,但在骨坏死区生长、修复过程中成骨作用明显增强、其结果使变细、疏松萎缩的骨小梁重新改造、塑形,最终钙化形成新生骨。

即往实验和临床观察经常采用血管活性药物,如丹参、尿激酶素,有一定的效果。本实验用丹参灌注作为不同用药疗效对照组。X 线表现,病理组织学、荧光标记在 2 周和 4 周与生理盐水对照组比较差异有显著性($P < 0.05$),说明疗效是肯定的。但与骨髓多能干细胞比较差异有显著性($P < 0.05$),提示后者显效的

时间更快捷、更容易诱导再骨化进程。病理组织学及四环素荧光标记发现,治疗后 2 周即可见大量间充质细胞增生,大量血管增生,周围骨小梁表面有明显新骨形成。在骨髓多能干细胞组治疗过程中,成骨诱导因子起关键作用。目前已知有 BMP、来源于破骨细胞的转化生长因子- β (TGF- β)以及骨钙素、I 型胶原等胞外蛋白。本实验中诱导成骨的可能机制为骨髓多能干细胞在分化为成骨细胞的过程中合成分泌成骨诱导因子,正反馈作用于成骨细胞,引起骨诱导,形成新骨。但成骨诱导因子产生机制及如何发挥成骨细胞的调控作用机理仍不清楚,有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Montma, Hungerford DS, Maryland B. Current concepts review. Surg 1995;77A:495.
- 2 童培建,吴云刚,肖鲁伟,等.股动脉药物灌注治疗激素性股骨头坏死的实验研究.中华骨科杂志 2001;12(21):749—754.
- 3 Tong PJ, Wu YG, Xiao LW, et al. An experimental research of femoral head necrosis treated with medication perfusion by femoral artery. Chin J Orthop 2001;12(21):749—754.
- 4 Jones JP. Intravascular coagulation and osteonecrosis. Clin Orthop 1992;(277):41—53.
- 5 冯周琴主编.实用血栓病学.郑州:河南科学技术出版社,1995:210.
- 6 Feng ZQ, editor. Practical thrombus disease. Zhengzhou: Henan Science and Technological Publishing Company, 1995: 210.
- 7 Islam A, Glomski C, Henderson ES. Endothelial cells and hematopoiesis: a light microscopic study of fetal, normal, and pathologic human bone marrow in plastic-embedded sections. Anat Res 1992;233(3):440—452.
- 8 Diaz-Flores L, Gutierrez R, Lope ZA, et al. Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. Clin Orthop 1992;(275):280—286.
- 9 Favas M. Primer on the metabolic disease and disorders of mineral metabolism. New York: Rava Press, 1993:50—60.
- 10 Matsui M, Saito S, Ohzono K, et al. Experimental steroid-induced osteonecrosis in adult rabbits with hypersensitivity vasculitis. Clin Orthop 1992;(277):61—72.
- 11 Berry L, Grant ME, McClure J, et al. Bone-marrow-derived chondrogenesis *in vitro*. J Cell Sci 1992;101 (Pt 2):333—342.
- 12 Noel D, Djouad F, Jorgense C. Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair. Curr Opin Investig Drugs 2002;(7):1000—1004.
- 13 Jiang Y, Jaliagirdar BN, Reinhard RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 2002; 418(6893):41—49.
- 14 Owen M. Marrow stromal stem cells. J Cell Sci (Suppl) 1988;10:63—76.

(收稿:2004-02-02 修回:2004-07-26)