

· 实验研究 Experiment research ·

骨髓多能干细胞移植治疗股骨头缺血性坏死的实验研究

白 彬, 曹海利, 王凯冰, 王宏辉, 徐 伟, 张守信

【摘要】目的 探讨骨髓多能干细胞移植治疗股骨头坏死的疗效和机制。方法 选用日本大耳白兔 60 只, 随机分为 A、B、C 3 组, 制成激素性股骨头坏死模型。A 组兔抽取骨髓体外分离后, 将骨髓干细胞注入钻孔减压的左侧股骨头内, 右侧仅钻孔减压; B 组模型未治疗组; C 组为正常组。各组动物于治疗后 8 周处死, 处死后分别进行各种指标检测, 包括钼靶 X 线摄影、CT 扫描、MR 扫描、常规 HE 染色切片、电镜扫描超微结构观察。结果 股骨头穿刺骨髓干细胞移植后 8 周, 骨质密度 X 线、CT 和 MR 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。电镜下可见成骨细胞内细胞器丰富, 空骨陷窝减少。经骨髓多能干细胞移植治疗后显示股骨头修复效果更佳。结论 骨髓多能干细胞移植治疗股骨头坏死能加速免股骨头的修复进程, 对股骨头坏死具有较高的治疗价值。

【关键词】股骨头坏死; 骨髓多能干细胞; 钻孔减压; 移植

中图分类号: R681.8 文献标识码: A 文章编号: 1008-794X(2007)02-0122-05

An experimental study on the treatment of femoral head necrosis with transplantation of marrow stem cells BAI Bin, CAO Hai-li, WANG Kai-bing, WANG Hong-hui, XU Wei, ZHANG Shou-xin. Department of Radiology, the Second Hospital Affiliated to Harbin Medical University Harbin 150086, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect and mechanism of transplantation of marrow multi-function stem cells in treating femoral head necrosis. **Methods** Sixty Japanese rabbits were divided into A, B and C groups randomly. After creation of the models of hormone induced necrosis of femoral head; A group was designated as the treatment, B as the control and C as the normal groups. The bone marrow of A group was extracted and isolated and then injected into the left femoral head and the right femoral head was decompressed by drilling only. The rabbits were killed at 8 weeks after the treatment and changes in various parameters were observed, including imaging data of molybdenum target films, CT and MRI; routine pathology with HE staining and ultrastructural alteration by electron microscopy. **Results** Eight weeks after the treatment of transplantation of marrow multifunction stem cells, the X-ray showed only a little change but the typical appearances were revealed by CT and MRI. Pathohistologic manifestation demonstrated decrease of empty bone lacuna, increase of osteoblast and new bone formation. Electron microscopy displayed abundant organelles in osteoblasts with few empty bone lacuna, in addition the transplantation of marrow multifunction stem cells could obtain better reconstruction for the involved femoral head. **Conclusions** The treatment of transplantation of marrow multifunction stem cells in femoral head necrosis could accelerate the process of repairing, worthy to be acknowledged as a good and valuable management in rabbits (J Intervent Radiol, 2007, 16: 122-126)

【Key words】 Femoral head necrosis; Marrow stem cells; Drilling decompression; Transplantation

股骨头缺血性坏死是临床常见难治性疾病, 近年来该病的发生率不断增高, 发病年龄趋于年轻

化。因其临床症状较重、致残率高而越来越引起医学同道的重视。尽管目前治疗方法很多, 且不断有新的方法问世, 但治疗效果都不十分理想。随着干细胞工程与组织学工程的进展, 骨髓多能干细胞移植已成为研究和治疗缺血性疾病的重要方法。本实验对家兔股骨头坏死模型进行自体骨髓多能干细胞移植, 观察其疗效, 初步探讨骨髓多能干细胞治

基金资助项目: 黑龙江省自然科学基金(D200560)

作者单位: 150086 哈尔滨医科大学附属二院放射介入科

(白 彬、曹海利、王凯冰、王宏辉、徐 伟);

哈尔滨医科大学基础医学院解剖学教研室(张守信)

通讯作者: 白 彬

疗股骨头坏死的机制。

1 材料与方法

1.1 动物及模型的制备

健康成年(20~26周龄)雄性日本大白兔60只,平均体重(2.5 ± 0.25)kg,由我院动物实验中心提供。模型制作:取40只兔臀肌注射氢化可的松,剂量每次8mg/kg,每周2次,连续注射8周。每周肌注青霉素2次,每次10万u/只,预防感染。8周后所有动物行影像学检查,证明已发生股骨头坏死后分为A、B两组,剩余20只正常兔为C组,注射同等量的生理盐水。

1.2 骨髓干细胞分离

从A组各兔分别经髂前上棘穿刺抽取2~3ml骨髓缓缓沿壁加入到盛有10ml淋巴细胞分离液(Ficoll)的离心管中,2000g离心20min,在上、中层液体界面处可见乳白色混浊单个核细胞层。将吸管轻轻插到白膜层,沿试管壁周缘吸取界面层单个核细胞,移入另一试管中,用PBS液反复洗涤以去除脂肪及组织液,加入PBS溶液,以1500g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,以EDTA4~6ml强化数分钟,弃去消化液,加入PBS,吹打成单细胞悬液,分别标号备用。

1.3 实验方法

1.3.1 干细胞移植 将A组动物置于DSA手术床上,经耳缘静脉注射戊巴比妥钠麻醉后,在兔髂前上棘和双侧股骨头区域备皮,局部消毒铺无菌单,切开皮肤,分离皮下组织暴露股骨干,于大粗隆后用微型电钻钻入5mm,改用20ml注射器针头在DSA透视下穿刺至股骨头下1mm处,左侧注入已分离、标号备用的自体骨髓多能干细胞原液1ml,并用明胶海绵封闭穿刺口,右侧为对照钻孔减压,关闭切口逐层缝合。术后给与青霉素(20万u/只)预防感染。

1.3.2 模型未治疗组(B组)和正常组(C组)未采取任何处理。8周后处死动物,进行各种指标观察与检测。

1.4 观察指标与检测方法

1.4.1 影像学观察 制作模型前后及处死前,分别行钼靶X线摄影、CT和MR扫描,采集影像学资料。

1.4.2 组织病理学检测 实验结束后处死动物,取双侧股骨头,沿中心冠状面剖开,甲醛固定、脱钙后进行常规HE染色,石蜡包埋。在400倍高倍镜下,任选5个高倍视野计数50个骨细胞空骨陷窝阳性

数;在软骨下区依次任选5个高倍视野,计数血管数目,求出平均值;任选5个视野测量10个骨髓腔内脂肪细胞直径,求出平均值。

1.4.3 电镜观察 4%戊二醛固定、脱钙3个月,环氧树脂包埋,透射电镜观察骨细胞改变,包括骨细胞形态、胞质、胞核和细胞器等。

1.4.4 统计学方法

实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学分析采用多样本的方差分析和Dunnett检验。

2 结果

2.1 大体改变

A组左侧移植组股骨头表面为亮白色,沿冠剖破开阻力大、骨质较硬,股骨头表面软骨较厚;右侧钻孔减压组股骨头表面为粉白色,沿冠剖破开阻力较左侧小、骨质略硬,股骨头表面软骨较左侧薄。B组股骨头表面为暗红色,关节软骨下骨质暴露,部分可见裂隙、变形,沿冠剖破开阻力小、骨质松脆,股骨头表面软骨较薄。C组股骨头表面为亮白色,沿冠剖破开阻力大、骨质硬,股骨头表面软骨厚。

2.2 影像表现

治疗前及治疗后8周处死前每组动物分别进行钼靶X线摄影、CT和MR扫描,前后对比观察。

2.2.1 钼靶X线摄影 实验前所有模型兔与正常兔股骨头相比较,结果骨密度略低,其他改变不明显,实验后A组两侧骨密度略低于正常,未见明显改变;B组骨密度明显降低,骨小梁稀疏。

2.2.2 CT扫描 A、B模型兔实验前双侧股骨头骨皮质较薄,内部骨密度较低,骨小梁变细或中断,可见小囊状透光区及小片状死骨;治疗后A组左侧股骨头骨密度明显增高,接近正常骨密度,CT值720Hu左右,关节面光整,内部放射状骨小梁清晰可见;右侧骨皮质较左侧薄,内部骨密度较左侧略低,CT值530Hu左右,可见骨小梁略细、部分中断,偶见囊状透光区(图1),左右CT值对比差异显著。B组较实验前CT改变加重,股骨头骨皮质较实验前更薄,股骨头表面骨皮质断裂、塌陷(图2),内部骨密度很低,CT值390Hu左右,大部分骨小梁中断伴大小不等囊状透光区,边缘硬化,可见斑片状死骨;C组双侧股骨头骨皮质厚,内部骨密度高,CT值830Hu左右,骨小梁呈放射状分布。

2.2.3 MRI成像 A组左侧股骨头MRI表现为T₁WI呈线样低信号,T₂WI呈高信号,右侧MRI表现为T₁WI呈不均匀低信号,T₂WI呈中等稍高信

号,周围不均匀稍低信号环绕,呈典型的双线征;B组 MRI 表现为 T₁WI 呈带状低信号,T₂WI 呈中等或高信号。

2.3 组织病理学观察

2.3.1 HE 染色 A 组左侧干细胞移植组治疗后 8 周,骨小梁变细不明显,毛细血管增多,骨细胞数接近正常,可见少量空骨陷窝细胞及成骨细胞数量明显增多,功能活跃,新骨增多。右侧钻孔减压组表现毛细血管略有增加,骨细胞略少,可见一定量的空骨陷窝细胞(图 3~6),骨髓移植与钻孔减压及钻孔减压与模型未治疗组(B 组)比较有显著性差异($P < 0.05$);B 组术后 8 周,病理改变加重,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颈松质骨处,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聚集,严重者出现骨小梁断裂(图 7);C 组股骨头软骨下毛细血管数目多,骨小梁排列规则整齐,骨细胞清晰,骨髓内脂肪细胞大小、分布均匀。各组量化指标见表 1。

2.3.2 电镜观察 A 组左侧干细胞组骨细胞状态完好,核膜完整清晰,线粒体、粗面内质网等细胞器丰富,骨基质清晰可见,骨小梁边缘以前成骨细胞为主(图 8);右侧在透射电镜下修复区的成骨细胞

表 1 各组实验兔结果对比统计分析

组别	骨髓移植 (A 组左侧)	髓心减压 (A 组右侧)	模型未治疗组 (B 组)	正常组 (C 组)
空骨陷窝率	16 ± 1.7 ^{△▲}	21 ± 2.0 [★]	26 ± 1.5	12 ± 2.3
脂肪细胞直径	33 ± 2.8 [△]	39 ± 2.3 [★]	52 ± 3.2	32 ± 2.2
毛细血管数	8.8 ± 1.5 [△]	7.1 ± 1.8 [★]	5.2 ± 2.3	9.0 ± 1.7
CT 值	720 ± 45 ^{△▲}	530 ± 37 [★]	390 ± 55	830 ± 35

注:△:骨髓移植组与髓心减压组 Dunnett 检验 $P < 0.05$;▲:髓心减压组与对照组 Dunnett 检验 $P < 0.05$;★:骨髓移植组与正常组 Dunnett 检验 $P < 0.05$

呈多角形,核模完整,可见线粒体、粗面内质网等细胞器。B 组电镜下骨基质走行紊乱,基质密度减低,可见坏死骨细胞,细胞核固缩,胞质内线粒体空泡变性,残余骨细胞,形态不规则状为多,细胞器稀少,核膜不完整;C 组骨细胞为扁椭圆形,位于骨陷窝内,表面多有突起,核异染色质丰富,可见散在溶酶体,有少量线粒体及粗面内质网。

3 讨论

股骨头缺血性坏死具有复杂的病理过程,临床对股骨头缺血性坏死的治疗主要有保守治疗(如药物、电刺激治疗和介入治疗等)和手术治疗(如全髋关节置换术,带血管或不带血管骨移植等),但各种疗法的效果均不能令人满意。

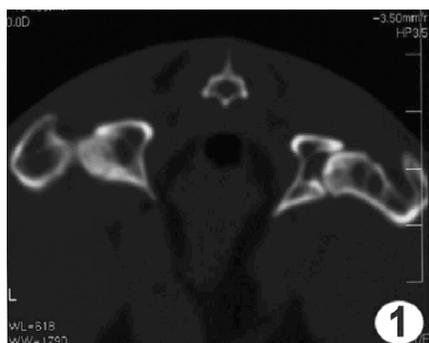


图 1 左侧股骨头修复良好,右侧密度低可见囊状透光区



图 2 B 组三维重建后可见右侧股骨头裂隙骨折

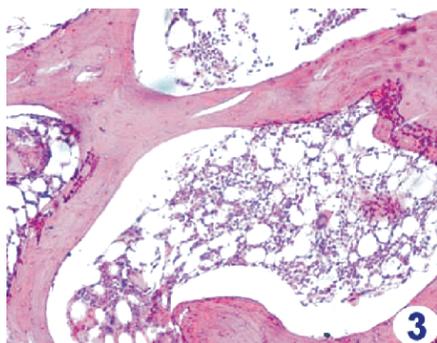


图 3 骨小梁结构连续完整接近正常

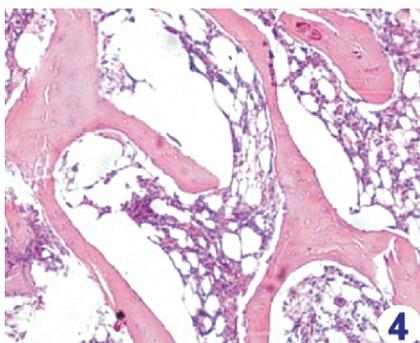


图 4 骨小梁细疏,部分中断

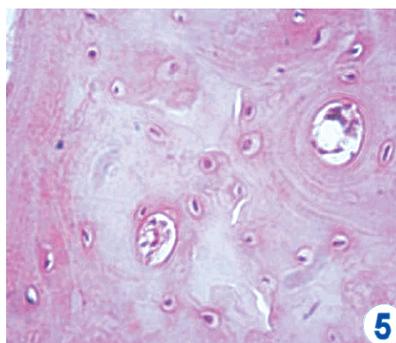


图 5 骨细胞未见明显减少,细胞核清晰,可减少量空骨陷窝

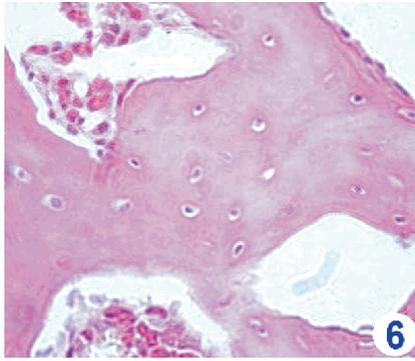


图 6 骨细胞稍减少,部分细胞核边集,空缺骨陷窝较多

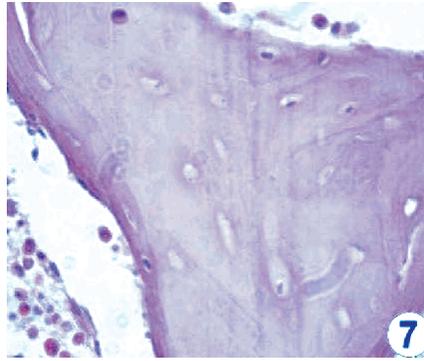


图 7 骨细胞明显减少,大部分细胞核边集、固缩,可见大量空缺骨陷窝

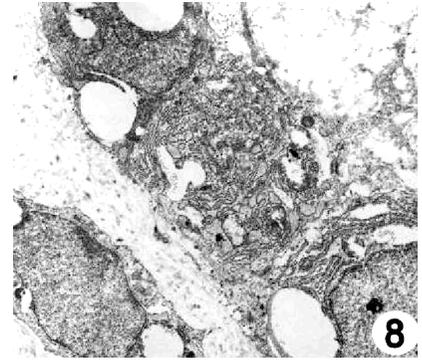


图 8 骨小梁边缘区可见前成骨细胞,成骨细胞内有丰富粗面内质网

目前,国内外骨髓干细胞研究领域主要是:心肌缺血^[1,2]、肢体缺血、脑损伤等方面,也有应用于股骨头缺血性坏死方面的实验研究^[3,4]。我们把骨髓多能干细胞移植与介入技术两者结合起来,将骨髓多能干细胞注入股骨头缺血坏死区,应用于股骨头缺血性坏死治疗。

实验结果显示 B 组股骨头内原有病理改变未见好转,而且坏死改变逐渐加重,说明停止使用激素后股骨头坏死病灶无明显自发修复现象。单 A 组则可见股骨头坏死区病理改变减轻并已发生部分修复,证明髓芯减压术治疗股骨头坏死有一定疗效。髓芯减压后同时进行自体骨髓干细胞移植组,大体、组织病理和影像改善较髓芯减压组更加明显,说明髓芯减压加自体骨髓干细胞移植后,股骨头坏死区修复作用更强,范围更广。

骨髓多能干细胞是骨髓的一种间充质细胞,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,可定向地分化形成各种组织细胞。近年来,随着对骨髓成骨潜能研究的深入,已证实骨髓基质细胞能在体外培养转化为成骨细胞^[5],在条件培养液中可成骨^[6-9]。本实验中发现骨髓移植后空缺骨陷窝数较其他组明显减少,局部骨细胞增加;影像资料显示骨小梁增多、增粗,说明骨髓移植后股骨头坏死区已发生明显成骨作用,所以我们认为移植后骨髓干细胞在局部缺血区,已诱导分化为骨细胞,参加了坏死区的修复。

骨髓多能干细胞内含有血管内皮祖细胞(EPC),EPC 主要存在于人和动物骨髓中,它是再造和新生血管的主要干细胞^[10,11]。通过动员自身或者借助外来骨髓多能干细胞,促进新血管生成和发生^[12],实验中骨髓干细胞移植组原股骨头坏死区血管数较其他实验组明显增多,说明已有大量新的血管生成,我们推测骨髓多能干细胞参与股骨头坏死区

新血管的生成、促进缺血区的血运重建。

另外,Hernigou 等^[13]研究发现,股骨头坏死组中代表骨髓干细胞分化能力的可分化成多种 MSC 系的原始细胞,即成纤维细胞克隆集落形成单位少于股骨头正常组。说明坏死股骨头中骨髓干细胞数量少、活性低,不能满足坏死股骨头修复的需要,通过移植后股骨头坏死区骨髓干细胞数量增加,有利于促进股骨头的修复作用。

骨髓干细胞具有多向分化潜能,同时具有取材容易、体外分离纯化相对简单、易于扩增等特点,而且利用自体骨髓干细胞移植不存在免疫排斥反应,不存在异体细胞和器官移植面临的免疫排斥问题。因此利用骨髓多能干细胞作为种子细胞治疗缺血性疾病具有很好的应用前景,为某些难治性疾病提供新的思路。

[参考文献]

- [1] Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Intracoronary human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction [J]. Dtsch Med Wochenschr, 2001, 126: 932 - 938.
- [2] Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in human [J]. Circulation, 2002, 106: 1913 - 1918.
- [3] Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting [J]. Clin Orthop, 2002, 1: 14 - 23.
- [4] Gangji V, Hauzeur JP, Matos C. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone marrow cells [J]. J Bone Joint Surg Am, 2004, 86: 1153 - 1160.
- [5] Gronthos S, Zannettino AW, Hay SJ, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow [J]. J Cell Sci, 2003, 116: 1827 - 1835.
- [6] Maniopoulos C, Soderk J, Melcher AH. Bone formation in

- vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adults[J] Cell Tissue Res, 1995, 254: 317.
- [7] Pittenger MF, Macky AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J] Science, 1999, 284: 143 - 147.
- [8] Noel D, Djouad f, Jorgense C. Regenerative medicine thorough mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair[J] Curr Opin Investig Drugs, 2002: 1000 - 1004.
- [9] Jiang Y, Jaliagirdar BN, Reinhard RH, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J] Nature, 2002, 418: 41 - 49.
- [10] Gangji V, Toungouz M, Hauzeur JP. Stem cell therapy for osteonecrosis of the femoral head[J] Expert Opin Biol Ther, 2005, Apr, 5: 437 - 42.
- [11] Urbin C, Heeschen C, Aicher A, et al. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells[J] Circulation, 2003, 108: 2511 - 2516.
- [12] Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation[J] Circulation, 2001, 103: 897 - 903.
- [13] Hernigou P, Beaujean F, Lambotte JC. Decrease in the mesenchymal stem-cell pool in the proximal femur in corticosteroid-induced osteonecrosis[J] J Bone Joint Surg Br, 1999, 81: 349 - 55.