

骨髓间充质干细胞对股骨头坏死缺损模型修复的组织学观察

孙伟 李子荣* 史振才 张念非 李艳 崔福斋 张岚 蔡哲

[摘要] 目的 研究骨髓间充质干细胞在治疗股骨头坏死动物模型的修复作用及价值。方法 建立兔双侧股骨头内骨缺损模型,并分为 3 组,A 组为制作缺损而不填充任何材料,B 组为单纯填充纳米人工骨,C 组填充纳米人工骨和骨髓间充质干细胞的复合材料。对植入后 4 周、8 周、12 周的股骨头行组织学检查。结果 B 组和 C 组在股骨头缺损修复成骨方面与 A 组有显著差异,C 组差异性更大。结论 骨髓间充质干细胞有较强的成骨作用,可促进股骨头坏死骨缺损的修复,对股骨头坏死的治疗有较大价值。

[关键词] 股骨头坏死;骨缺损;骨髓间充质干细胞;兔

Histological observation on repair of bone mesenchymal stem cell in rabbit osteonecrosis of the femoral head defect model SUN Wei, LI Zi-rong, SHI Zhen-cai, et al. Center for Osteonecrosis and Joint Preserving & Reconstruction, Department of Orthopaedic Surgery, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

[Abstract] **Objective** To evaluate the effectiveness of mesenchymal stem cell (MSC) in osteonecrosis of the femoral head defect (ONFH) repair. **Methods** Aniaml model of ONFH defect were established with rabbits, which were divided into 3 groups, group A did not infill anything as control, nano Hydroxyapatite/collagen (nHAC) as group B, nHAC + MSC as group C. Histology change were investigated 4, 8, 12 weeks after operation respectively. **Results** groups B and C were different with group A. The difference between groups A and C was more significant. **Conclusion** Mesenchymal stem cell has a strong activity of osteoconduction, it has a value in repairing the bone defect of ONFH and the treatment of ONFH.

[Key words] osteonecrosis of the femoral head; bone defect; bone mesenchymal stem cell; rabbit

中图分类号:R318.5 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2005)01-0004-03

[本文著录格式] 孙伟,李子荣,史振才,等.骨髓间充质干细胞对股骨头坏死缺损模型修复的组织学观察[J].中国康复理论与实践,2005,11(1):4-6.

在 20 世纪 70 年代,Friedenstein 等首次报道,骨髓标本中小部分贴附细胞在培养过程中能够分化为类似骨和软骨的集落^[1]。后来证实,这些集落是存在于骨髓基质系统中具有多项分化潜能的干细胞,能被不同的诱导因子诱导,分化为骨、软骨、肌肉、脂肪,称为骨髓基质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)。股骨头坏死(osteonecrosis of the femoral head, ONFH)为进展性和致残性疾病,股骨头坏死保存自身股骨头的治疗是临床的一大难题。近年来,组织工程技术发展迅速,有望通过这些技术提高对股骨头坏死的治疗水平。本试验利用骨髓间充质干细胞,探索股骨头治疗的新方法。

1 材料与方法

1.1 模型制作和 MSC 的培养及鉴定 新西兰白兔 45 只,雌雄不限,体重 2.5~3.0 kg,在 3%戊巴比妥静脉

麻醉下,取双髋关节前外侧切口,显露股骨头及股骨颈前上部,行 Light Bulb^[2]手术,在软骨与骨的交界处,用电钻以 5 mm 钻头向股骨头前内侧钻孔,然后用特制刮匙向内侧潜行刮除松质骨至软骨下骨,约占股骨头总体积的 60%~70%,模拟骨坏死行病灶清理术。在骨缺损周围用石炭酸烧灼,使骨细胞和骨髓细胞坏死。随机分 3 组,每组 15 只。A 组不作填充为空白对照,B 组填充纳米人工骨(nHAC,由清华大学材料科学与工程系提供),C 组填充 nHAC 和 MSC 的复合物。

将 C 组兔以 3%戊巴比妥麻醉后,1%碘伏消毒,在髂嵴背侧用 16 号骨髓穿刺针穿刺骨髓,取出套管针后用注射器抗凝下(内装 1000 U/ml 肝素溶液 3 ml)抽取骨髓,每侧抽取 3 ml(每只兔 6 ml)。吹打成细胞悬液,1.073 g/L Percoll 分离液 1500 r/min 离心 20 min,洗涤。培养液主要成分包括:1640、体积分数 15%的胎牛血清、10 mmol/L 甘油磷酸钠、50 mg/ml 维生素 C、 10^{-8} M 地塞米松、青霉素及链霉素各 100 IU/ml 等,pH=7.2。将骨髓用培养液冲洗,用滴管吹打均匀,如仍有未打散的骨髓团块,将其吸入注射器中,再换 10 ml 注射器针头吹出,直至完全打散;细胞筛过滤。将细胞悬液收集到离心管中,1500 r/min 离心 5 min;去上清液,加入 10 ml Tris-NH₄Cl,4℃静置 10 min 以裂

基金项目:1.首都医学发展科研基金重大科技联合攻关项目(2002-1007);2.卫生部属(管)医疗机构临床学科重点项目。

作者单位:1.100029 北京市,中日友好医院骨科骨坏死与关节保留重建中心(孙伟、李子荣、史振才、张念非);2.100084 北京市,清华大学材料科学与工程系(李艳、崔福斋);3.100029 北京市,中日友好临床医学研究所免疫室(张岚、蔡哲)。作者简介:孙伟(1974),男,医学博士,研究方向:组织工程、骨坏死、关节外科,*通讯作者:李子荣。

解红细胞。1500 r/min 离心 10 min, 去上清, 加入 1640, 混匀, 1500 r/min 离心 10 min, 2 次; 去上清液后加入 1640, 计数(0.5% Trypan Blue 180 μ l + 细胞悬液 20 μ l)。

细胞生长到 80% 融合后传代。吸去瓶中培养液, 每瓶中加入含 0.25% 胰蛋白酶和 0.01% EDTA 消化液 3 ml, 室温消化 1 min 左右(显微镜下控制时间), 加入含血清培养基中止消化; 轻轻吹打, 使细胞脱离瓶壁, 混匀, 吸集于 2 支 50 ml 离心管中, 离心, 去上清, 计数并调整细胞浓度为 1×10^6 /ml。将配好的细胞悬液以每孔 1 ml 滴在材料表面, 入培养箱 4 h 后, 再加培养液 1 ml。以倒置相差显微镜观察细胞的生长状况, 培养前后碱性磷酸酶染色和 CD₃₄、CD₆₈、CD₁₀₅ 的流式细胞仪检测, 取部分样品行共聚焦显微镜和环境扫描电镜观察。将细胞和材料共同培养 2 周后做动物股骨头缺损模型, 回植体内。每组兔分别在术后 4、8、12 周处死。

1.2 组织学观察 取各组兔双侧股骨头, 10% 甲醛溶液中固定 48 h 以上, 采用混合脱钙技术(混合脱钙液: 甲醛 100 ml、甲酸 80 ml、盐酸 70 ml、三氯化铝 60 g、冰醋酸 25 ml、生理盐水 1000 ml) 室温脱钙 2 d, 直接入 70% 乙醇 10 h, 80% 乙醇 14 h, 95% 乙醇 10 h, 无水乙醇 I 10 h, 无水乙醇 II 10 h, 丁香油 10 h, 正丁醇 14 h, 二甲苯 I 1 h, 二甲苯 II 1 h, 浸蜡 10 h, 作定向石蜡包埋, 横向切片, 厚 4 μ m。

1.2.1 苏木精-伊红(HE)染色 观察骨痂的形态结构变化。切片厚 6 μ m。

1.2.2 改良 Golder 三染 用蒸馏水湿片, 甩去多余水分, 用苏木精: 氯化铁(50: 50) 染 3 min, 温水漂洗 2 次, 丽春红-酸性品红染液染 12 min, 0.5% 醋酸 I 漂洗, 0.5% 磷钼酸染 3 min, 0.5% 醋酸 II 漂洗, 亮绿染 3~5 min, 0.5% 醋酸快速漂洗, 空气中干燥, 二甲苯透明, 封片, 观察纤维组织、nHAC 降解以及新生骨形成情况。

1.2.3 不脱钙切片的电镜观察 取股骨头标本断面 $1 \times 1 \times 5$ mm 大小置于树脂包埋, 标本在 6% 戊二醛和 4% 多聚甲醛混合固定液中, 4 $^{\circ}$ C 固定 24 h。对标本进行修整, 0.1 M 二甲砷酸钠缓冲液漂洗 5~7 d, 1% 四氧化锇溶液固定 2 h。梯度酒精和乙腈脱水。醋酸异戊酯保存 12 h, 二氧化碳临界点干燥, 真空喷金, 电镜观察。

1.3 组织学评分和统计学处理 根据 Lane-Sandhu 骨移植组织学评分法^[3]对 3 组样本各时间点进行评分, 结果用 SPSS 11.0 软件行方差分析。P < 0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 MSC 分离与培养 MSC 接种于培养瓶后 24 h 有

少量贴壁, 初期贴壁细胞不规则或呈短梭型; 之后贴壁细胞分裂增值, 形态也渐变为长梭形(封三图 1.1)。MSC 满瓶后, 进行传代或与 nHAC 复合培养。MSC 和 nHAC 复合良好, 共聚焦显微镜观察和环境扫描电镜均可见细胞生长。流式细胞仪检测显示, 诱导培养后的传代 MSC 和从材料消化下来的 MSC, CD₃₄、CD₆₈ 表达均为阴性, CD₁₀₅ 表达阳性, 证明它们并非造血类细胞、单核及巨噬细胞或成纤维细胞。

2.2 HE 和改良 Golden 三染 A 组术后有 2 只 3 侧发生塌陷, 术后 4 周, 周边有新骨形成, 中心部为疏松的纤维肉芽组织; 8 周后, 周边为逐渐形成的骨壁, 中心部为纤维组织, 无骨形成; 12 周, 中心部仍为纤维组织, 无骨组织充填。

B 组术后 4 周, 周边有少量成骨反应, 新生组织向中心部长入, 有大量巨噬细胞浸润(封三图 1.2); 8 周, 周边有一定量骨形成, 成骨明显比 A 组强, 可见异物巨细胞, 周边为骨形成带; 12 周, 材料与周围组织边界模糊, 材料中骨组织长入, 材料降解, 骨小梁替代, 仍可见异物巨细胞, 部分空腔仍存在。

C 组术后 4 周, 充填区周围有肉芽组织形成, 间充质细胞大量增生, 新生组织开始呈网状长入充填物, 周边有明显的成骨反应, 有较多的新骨形成, 纤维肉芽样组织向 nHAC 长入; 8 周, 周边新骨带明显增宽, 成骨反应向中心部推进(封三图 1.3); 12 周, 部分充填区为幼稚的骨小梁所占据, 表面有较多的成骨细胞, 部分充填区广布相对较成熟的骨小梁, 但较正常骨小梁粗, 排列不够规则。

2.3 电镜观察 A 组缺损区在各时间段见纤维组织结构, 无骨小梁结构。B 组术后 4 周, 材料与宿主骨组织之间的微结构、材料和骨基质交界仍清, 材料仍保持其多孔的框架结构, 多层的新生骨组织从周围延伸出来; 8 周, 材料和骨基质交界不清, 材料开始降解; 12 周材料与周围组织边界模糊, 骨小梁替代材料。C 组, 4 周材料与宿主骨组织之间的微结构、材料和骨基质交界欠清; 8 周, 新生骨从宿主骨长出, 材料部分降解, 多孔框架结构不清; 12 周可见成熟骨组织的连续平行纤维结构网络(封三图 1.4)。

2.4 组织学评分 术后各时间点, B、C 组与 A 组间有非常显著性差异(P < 0.01), B 组与 C 组间也有非常显著性差异(P < 0.01)。

3 讨论

MSC 获得较易, 体外培养扩增和导入外源基因也相对方便, 因此 MSC 具有实际应用的潜在优势。

股骨头坏死常累及中青年, 且多为双髋发病, 推测我国 ONFH 患者在 300 万~500 万之间。根据对该病自然病程的研究, 未经有效治疗, 约 80% 会在 1~4 年

内进展到股骨头塌陷。因此保存自体股骨头,防止进一步塌陷是治疗的主要目标。保髋手术的方法很多,如髓心减压^[4]、带血管蒂的腓骨移植^[5]、截骨术^[6]、血管束植入、表面置换^[7]等,均取得一定疗效,但没有一种技术是完全满意的。

表 1 组织学评分表

| 组别 | n | 4 周 | 8 周 | 12 周 |
|----|----|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| A | 10 | 0.2±0.42 | 1.9±0.74 | 1.8±0.63 |
| B | 10 | 3.8±0.63 ^a | 7.5±0.71 ^a | 11.2±0.42 ^a |
| C | 10 | 5.7±0.48 ^{a,b} | 8.9±0.57 ^{a,b} | 11.8±0.42 ^{a,b} |

注:a:与 A 组比较, $P<0.01$; b:与 B 组比较, $P<0.01$ 。

骨组织工程学是应用生命科学和工程学的原理与技术,设计、构造、培育和保养活细胞,研究生物替代物,修复和重建人体组织器官的结构,维持或改善组织器官功能的一门新兴学科。组织工程的三要素可归纳为支架材料、种子细胞、信号因子。在支架材料的选择上,国内有徐晓良等^[8]使用 BMP/胶原/珊瑚复合人工骨用于股骨头缺损模型的,但胶原/珊瑚复合人工骨很难降解等缺点限制了它们的使用。纳米人工骨复合材料是由清华大学材料科学与工程系研制开发,依据仿生原理制备的纳米骨框架材料,该支架具有降解与新骨生长匹配,接近自体骨框架以及可供成骨细胞贴附生长繁殖的优点^[9];在种子细胞的使用方面,骨髓基质干细胞^[10]具有强大的分化潜能和增殖能力,其来源、分离方法、分化组织类型方面在修复股骨头坏死缺损上有其独特的优势。目前,对 MSC 的植入体内是否促进成骨,仍存在争议。Fialkov 认为复合 MSC 对成骨没有意义^[11]。但多数的研究还是证实 MSC 在成骨方面起作用^[12-13]。临床上,法国的 Hernigou^[14]和比利时的 Gangji^[15]分别使用自体的骨髓细胞修复股骨头坏死病灶清除后的缺损,均取得良好的疗效。

本研究证实, MSC 有良好的诱导成骨能力,术后 4 周即有明显的成骨反应和新骨形成,比单纯 nHAC 植入和空白对照的组成骨反应出现早且成骨能力大大提高。随着活组织的长入和材料的逐渐降解,新骨不断向中心部延伸,12 周基本修复了股骨头的骨缺损区。其成骨方式主要为膜内成骨,亦可见部分软骨内成骨,比单纯 nHAC 植入和空白对照组提高了骨形成的质量且缩短了骨修复的生理过程。在实验观察的各时相未见对 nHAC 的明显异物反应。但对复合在 nHAC 上的 MSC 在体内的转化和生长过程,仍有待进一步研究。

本试验利用组织工程技术技术,探索股骨头治疗的新领域。从组织学上证明了 nHAC 和 MSC 在股骨头缺损修复中的作用。MSC 有较强的成骨作用,是修

复股骨头骨缺损的良好移植细胞,可促进骨缺损的修复,对股骨头坏死的治疗有较大价值。为其临床应用提供理论和试验依据,为临床治疗股骨头坏死探索更好的方法,将对股骨头坏死的防治产生巨大的社会及经济效益。

[参考文献]

[1] Friedenstien AJ, Petrakova KV, Kurolesova AL. Hererotopic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenetic and he matopoietic development[J]. Transplantation, 1968, 6(2): 230 - 247 .

[2] Lieberman JR, Berry DJ, Mont MA, et al. Osteonecrosis of the hip: management in the twenty-first century[J]. J Bone Joint Surg Am, 2002, 84-A(5), 834 - 853 .

[3] Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting[J]. Orthop Clin North America, 1987, 18 : 213 - 225 .

[4] Mont MA, Jones LC, Sotereanos DG, et al. Understanding and treating osteonecrosis of the femoral head[J]. Instr Course Lect, 2000, 49 : 169 - 185 .

[5] Aldridge JM, Berend KR, Gunneson EE. Free vascularized fibular grafting for the treatment of post collapse osteonecrosis of the femoral head. Surgical technique[J]. J Bone Joint Surg Am, 2004, 86A(Suppl 1): 87 - 101 .

[6] Mont MA, Fairbank AC, Krackow KA, et al. Corrective osteotomy for osteonecrosis of the femoral head[J]. J Bone Joint Surg Am, 1996, 78 : 1032 - 1038 .

[7] Beaulé PE, Schmalzried TP, Campbell PA, et al. Duration of symptoms and outcome of hemiresurfacing for hip osteonecrosis[J]. Clin Orthop, 2001, 385 : 104 - 117 .

[8] 徐晓良,同志勤,王坤正,等. BMP/胶原/珊瑚复合人工骨修复股骨头骨缺损的实验研究[J]. 骨与关节损伤杂志, 2000, 15(3): 209 - 211 .

[9] 廖素三,崔福斋,张伟. 组织工程中胶原纳米基骨复合材料的研制[J]. 中国医学科学院学报, 2003, 25(1): 36 - 38 .

[10] Matsumura G, Miyagawa Tomita S, Shin' oka T. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts in vivo[J]. Circulation, 2003, 108(14): 1729 - 1734 .

[11] Fialkov JA, Holy CE, Shoichet MS. In vivo bone engineering in a rabbit femur[J]. J Cranio Surg, 2003, 14(3): 324 - 332 .

[12] Tabata Y. Tissue regeneration based on tissue engineering technology [J]. Congenit Anom (Kyoto), 2004, 44(3): 111 - 124 .

[13] Kon E, Muraglia A, Corsi A, et al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of long bones[J]. Biomed Mater Res, 2000, 49(3): 328 .

[14] Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting[J]. Clin Orthop, 2002, 405 : 14 - 23 .

[15] 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(6): 1153 - 1160 .

(收稿日期: 2004-12-14)



图 1.1 接种前的 MSC
(100 ×)

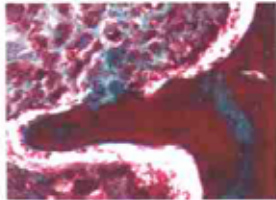


图 1.2 C 组接种 8 周
(HE, Golden 三染, 100 ×)

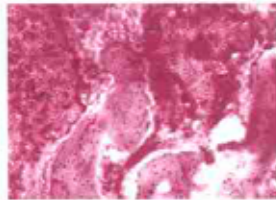


图 1.3 B 组接种 4 周
(HE, 100 ×)

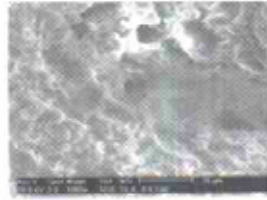


图 1.4 C 组接种 12 周
(电镜, 1000 ×)