

# 自体外周血干细胞与脱钙骨复合移植修复骨缺损的临床应用

刘淑恒\*, 董英海\*\*, 高学纯, 卜海富, 朱如里, 张之栋  
(安徽医科大学第一附属医院骨外科, 安徽 合肥 230032)

**摘要** 目的: 观察自体外周血干细胞(APBSC)与脱钙骨(DBM)复合移植治疗良性骨肿瘤术后骨缺损的疗效。方法: 对 12 例骨肿瘤患者, 手术切除骨肿瘤脱钙骨填充骨缺损, 术后第 7 天行骨髓动员, 每天皮下注射特立立 3.0 μg/kg, 连续 3 d, 第 4 天静脉滴注 10 mg 地塞米松后采集 APBSC。在 X 线电视透视下将一枚骨穿针准确穿入骨缺损部位, 然后抽取自体外周血干细胞即可注入骨缺损部位。通过术后连续 X 线片, 了解其骨缺损修复能力。结果: 12 例病人术后得到随访, 时间为 4~16 个月, 在 2~4 个月以内均开始有不同程度的骨化, 成骨效应满意。结论: 自体外周血干细胞(APBSC)/脱钙骨(DBM)复合移植是一种治疗骨缺损有效的新方法。

**关键词** 移植; 造血干细胞; 脱钙骨; 骨肿瘤; 骨缺损

**Clinical application in repair of bony defects by grafting of autologous peripheral blood stem cell combine with demineralized bone matrix** LIU Shu heng, DONG Ying-hai, GAO Xue chun, BU Hai fu, ZHU Ru-li, ZHANG Zhi-dong. Department of Orthopaedics, the 1st Affiliated Hospital of Anhui Medical University (Anhui Hefei, 230022, China)

**Abstract Objective:** To observe the effect of repairing segmental bony defects by the grafting of autologous peripheral blood stem cells (APBSC) and demineralized bone matrix (DBM). **Methods:** 12 patients were reported, the bony defects of the benign bone tumors resections were repaired by DBM, marrow mobilization at 7 days postoperatively, GM-CSF 3.0 μg/kg was subcutaneously injected daily for 3 days. On the 10th day, APBSC were harvested on the 3rd hour after intravenous administration of 10mg dexamethasone. A marrow needle was inserted into the site of the bone defects under the X ray, APBSC were aspirated and injected immediately into the site of bone defects. The ability of repairing segmental bony defects were observed with serial radiography. **Results:** 12 cases were followed up from 4 to 16 months after operation. All the cases healed primarily, variously degrees of ossification were found in the cases from 2 to 4 months after operation. **Conclusion:** APBSC/DBM is a effective and new method for the repair of bony defects.

**Key words** Transplantation, hematopoietic stem cell; Demineralized bone; Bone neoplasm; Bone defect

采用自体骨髓移植治疗骨缺损国内外已有文献报道。然而, 骨髓移植来源有限, 尤其是当移植所需骨髓量较大时, 病人面临承受创伤大、痛苦大、心理

负担重、极易引起感染等弊端, 而且骨髓中干细胞含量有限, 干细胞浓度低, 限制了骨髓的应用范围。最近, 我们采用自体外周血干细胞(Autologous peripheral blood stem cells, APBSC)同种异体脱钙骨(Demineralized bone matrix, DBM)复合移植修复兔桡骨骨缺损, 发现有良好的诱导成骨作用<sup>[1]</sup>。在此基础上, 临床应用 APBSC/DBM 复合移植治疗良性骨肿瘤术后骨缺损病人 12 例, 取得较好的临床疗效, 报告如下。

\* 现作者单位: 山东大学临床医学院暨济南市中心医院骨外科, 山东 济南 250013

\*\* 现作者单位: 上海第二医科大学附属仁济医院骨外科

基金项目: 安徽省卫生厅科研基金资助课题(编号: 卫科秘 1998 105 号)

安徽省教育厅科研基金资助课题(编号: 教科技 1998 19 号)

通讯作者: 刘淑恒 Tel: 0531 5695493 E-mail: tianheng4959@sina.com

## 1 材料与方法

**1.1 临床资料** 本组 12 例,男 8 例,女 4 例;年龄 12~48 岁,平均 32.5 岁。肿瘤分类:非骨化性纤维瘤 1 例,在右胫骨中段;动脉瘤样骨囊肿 2 例,均在左胫骨下段;骨囊肿 3 例,其中左肱骨上端 1 例,左股骨粗隆区 2 例;骨嗜酸性肉芽肿 1 例,在右股骨粗隆区;骨巨细胞瘤(I 级) 5 例,右肱骨上段 2 例,其中 1 例合并有病理性骨折,左肱骨上段 1 例,右股骨下段 2 例。骨缺损最大范围为  $8.0\text{ cm} \times 5.5\text{ cm} \times 4.6\text{ cm}$ ,最小范围为  $3.0\text{ cm} \times 2.5\text{ cm} \times 2.1\text{ cm}$ 。

**1.2 DBM 的制备** 参照柯新华<sup>[2]</sup>的制备方法。

**1.3 手术方法** 手术时彻底清除肿瘤病灶,直至病灶周围有鲜液渗出(病灶周围用石碳酸或无水酒精灭活)。取出已制备好的 DBM 浸入含有  $2 \times 10^4$  U 庆大霉素的 1 000 ml 生理盐水中 0.5 h,复用生理盐水冲洗 DBM,去除其中的杂质,使 DBM 成透明状。一般情况下,骨缺损小的病灶多用松质骨骨块,骨缺损大的病灶加一些皮质骨条,作为支撑物。根据病灶大小植入已清洗干净的 DBM,放负压引流,术后 24~48 h 拔除引流。术后第 7 天,检查切口无红肿、渗出等感染征象,开始进行骨髓动员。每天 4 pm 皮下注射特立立  $3.0\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ (批号:19991027,厦门特宝生物工程有限公司)。连续 3 d,第 10 天采用血细胞分离机(CS-3000plus 型, Baxte 公司, 美国),选择外周血干细胞分离程序 1,全血流速 50~55 ml/min,根据病人在骨髓动员后外周血中的 CD<sub>34</sub> 阳性细胞数,一般摄定处理外周血 6 500 ml,分离后血袋中 APBSC 混悬液约 50 ml,采集前 3 h 静脉滴注地塞米松 10 mg。将血袋放在恒温离心机(J-6M 型, Beckman 公司, 美国)中离心,摄定 3 000 rpm  $\times$  8 min,温度为摄氏 4℃进行离心浓缩。根据骨缺损的大小,去除大部分血清和红细胞,保留 5~10 ml,然后混匀,在 C 型臂 X 线机透视下,根据骨缺损病灶的大小,将 APBSC 经皮从不同方向注射到骨缺损部位。

**1.4 观察指标** DBM 在 X 线片上是透光的,不显影或只显示低密度影,因此判断成骨的标准为:①与原 X 线片对比骨腔密度增加,说明 DBM 已有骨化;②骨腔密度显著增加,说明 DBM 已基本骨化;③骨腔基本消失;④骨腔完全消失。术后立即和第 4、8、16、24、32、40、48、56 周各摄 X 线片 1 次。观察手术后的并发症与后遗症。

## 2 结果

12 例手术后切口均 I 期愈合,无一例发生感染,

无明显的排异反应。12 例术后得到 4~16 个月随访。临床愈合时间 3~7 个月。到目前为止尚未发现病灶复发或症状加重。典型病例 X 线见图 1~6。

并发症:有 3 例病人在骨髓动员时,第 2 天出现发热(体温  $37.4\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 38.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),没做任何处理,2~3 d 后自行消失。在刚开始采集 APBSC 时,有 2 例病人出现口唇麻木,其中 1 例出现轻度肌肉抽搐等低血钙症状,立即静脉缓慢静推 10% 葡萄糖酸钙 10 ml,症状缓解。以后我们在 APBSC 采集前,先预防性口服 10% 葡萄糖酸钙,未再发生类似不良反应。

## 3 讨论

**3.1 自体外周血干细胞的成骨潜能** 自体外周血干细胞具有成骨作用,已在动物实验中得到证实<sup>[1]</sup>。在生理条件下,外周血中干细胞数量极低,只占骨髓中干细胞的 1/10~1/100<sup>[3]</sup>,从外周血采集足够量的干细胞比较困难,因此不能满足于临床应用的需要。随着血液病学的发展,大量研究证明,骨髓动员后,外周血中的干细胞数量能较动员前增加几倍、十几倍、数十倍、甚至上百倍<sup>[4]</sup>。因此可以先进行骨髓动员,将病人骨髓中的干细胞释放至外周血中,提高外周血中干细胞的浓度,进行外周血干细胞分离采集前 3 h 静滴地塞米松 10 mg,可以促使骨髓中干细胞释放至外周血<sup>[5]</sup>。这种干细胞来源于骨髓,与骨髓干细胞具有相同的生物学特性。我们将骨髓动员后的外周血与骨髓中干细胞数量进行比较,结果骨髓动员后能明显提高外周血干细胞计数<sup>[6]</sup>。DBM 在 X 线片上是透光的,不显影或只显低密度影,APBSC 与 DBM 复合移植术后成骨作用的判断,只能依靠术后 X 线片的表现,用不同时间的 X 线片进行对比,确定骨缺损骨化修复的程度。

**3.2 并发症的预防** 本组病人有 3 例在骨髓动员的第 2 天出现低热,为皮下注射特立立后的正常药物反应。由于在 APBSC 采集时,使用的淋巴细胞分离液中含有抗凝剂,有导致病人在 APBSC 采集过程中出现低血钙症状的可能,本组病人中有 2 例在 APBSC 采集过程中出现口唇麻木,其中 1 例出现轻度肌肉抽搐等低血钙症状,因此在 APBSC 采集前,预防性口服 10% 葡萄糖酸钙,可以避免在 APBSC 采集过程中有可能发生的低血钙症状。

**3.3 APBSC/DBM 移植修复骨缺损的优越性** ① APBSC 来源广泛、制备方便;② APBSC 浓缩液以其容积小、干细胞含量高的特点,正好填充在 DBM 的空隙内,最大限度地利用了骨腔的空间,并且可在 C

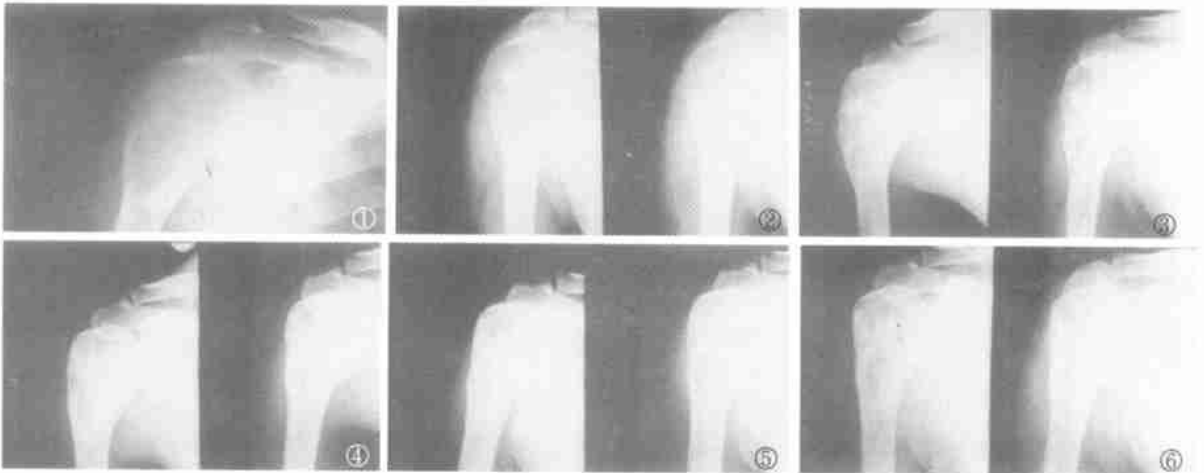


图 1 术前 X 线片; 右肱骨上段侵及骨骺的溶骨性病灶, 无反应性新骨生成, 病变部位骨皮质膨胀变薄, 呈肥皂泡样改变, 有病理性骨折 图 2 术后即刻 X 线片 图 3 术后 4 个月骨密度增加明显, 有新生骨痂生长 图 4 术后 8 个月骨腔影模糊, 有大量新生骨痂充填骨腔 图 5 术后 10 个月骨腔基本消失 图 6 术后 16 个月, 右肩关节功能恢复正常

Fig.1 Preoperative radiographic view: Humeral superior segment with epiphyseal osteolytic lesion, non-rective new bone was generated. Cortical bone of pathologic place turned into thin and soap-bubbling alteration, with pathologic fracture Fig.2 Instantly post-operative radiogram Fig.3 Four months after operation, X-ray film showed bone density obviously increased, with new bony callus Fig.4 Eight months after operation, X-ray film showed vague image of bony cavity, filled with massive new bony callus Fig.5 Ten months after operation, X-ray film showed bony callus disappeared basically Fig.6 Sixteen months after operation, right shoulder joint function was recovered

型臂 X 线机透视下, 准确地注射到骨缺损的部位, 发挥有效的成骨作用; ③ APBSC/DBM 复合移植避免了传统手术中自体采骨给病人带来的痛苦, 以及供区新的骨缺损等一系列并发症, 对机体创伤减小到最低限度, 移植处理几乎达到无创伤; ④ 与人工骨比较, DBM 具有良好的生物相容性、生物降解性并能在体内吸收被新骨所替代; ⑤ APBSC/DBM 复合移植具有的可塑形, 不仅可在骨科, 还可广泛应用于颅面外科及整形外科; ⑥ APBSC/DBM 复合移植所需费用不高, 与已经商品化的人工骨比较, 费用较低。

#### 参考文献

- 1 吴成如, 董英海, 高学纯. 自体外周血干细胞与脱钙骨复合移植治疗兔桡骨缺损的实验研究. 中华外科杂志, 2001, 39(2): 144-146.
- 2 柯新华, 林贵德, 王民刚, 等. 同种脱钙骨基质和骨基质胶制备及其生物学效应. 第三军医大学学报, 1994, 16(2): 445-449.
- 3 Hoglund M, Smedmyr B, Bengtsson, et al. Mobilization of CD34+ cells by glycosylated and nonglycosylated G-CSF in healthy volunteers: A comparative study. Eur J Haematol, 1997, 59: 177-183.
- 4 刘开颜, 郭乃榄. 自体外周血干细胞移植. 临床内科杂志, 1997, 14(3): 115-116.
- 5 王良绪, 禹涛, 赵昕, 等. 自体外周血干细胞的动员和采集及其移植效果的研究. 中华内科杂志, 1995, 34(10): 659-663.
- 6 刘淑恒, 董英海, 高学纯. 自体外周血与骨髓中干细胞数量的比较. 临床骨科杂志, 2003, 6(1): 12-14.

(收稿日期: 2003-09-17 本文编辑: 王宏)

## • 读者 • 作者 • 编者 •

### 关于一稿两投和抄袭等现象的处理声明

文稿的一稿两投、抄袭、假署名、弄虚作假等现象属于科技领域的不正之风, 我刊历来对此加以谴责和制止。为防止类似现象的发生, 我刊一直严把投稿时的审核关, 要求每篇文章必须经作者单位主管学术的机构审核, 附单位推荐信(并注明资料属实、无一稿两投等事项)。希望引起广大作者的重视。为维护我刊的声誉和广大读者的利益, 凡核实属于一稿两投和抄袭等现象者, 我刊将择期在杂志上提出批评, 刊出其作者姓名和单位, 并对该文的第一作者所撰写的一切文稿, 2 年内拒绝在本刊发表, 同时通告相关杂志。欢迎广大读者监督。

本刊编辑部