

骨髓间质干细胞移植治疗股骨头缺血性坏死

Grafting of bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of femoral head necrosis

谢利民

XIE Limin

关键词 股骨头坏死; 骨髓干细胞 Key words Femur head necrosis Bone marrow stem cells

近年随着干细胞技术的兴起和对股骨头坏死发病机制的深入认识,利用骨髓干细胞移植治疗股骨头缺血性坏死呈现了良好的发展前景。

1 骨髓间质干细胞的生物学特性

骨髓间质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是一种增殖能力较强、存在于骨髓非造血组织中的多能干细胞。BMSCs 通过表达大量的受体与造血干细胞表面蛋白直接反应,同时分泌 IL-6、IL-7、IL-8、IL-11~15、M-CSF、巨核细胞集落刺激因子 (M-CSF)、Flt-3、基质细胞源性生长因子 (SDF) 和 SCF 等细胞因子,具有促进造血细胞增殖和分化的作用,参与支持和调控造血,帮助造血细胞的黏附和归巢^[1]。

BMSCs 具有多向分化潜能,在适当的环境下, BMSCs 可以分化为中胚层细胞,也可以跨越胚层的界限,向外胚层及内胚层来源的组织细胞分化,如成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌细胞、神经元样细胞和肝细胞等^[2]。BMSCs 可诱导分化为成骨细胞已在体内外实验中得到证实,可诱导成骨的因子有地塞米松、 β -磷酸甘油、维生素 C、1,25-(OH)-维生素 D₃、IL-6、IL-11、透明质酸、铜、胰岛素样生长因子结合蛋白、碱性成纤维细胞生长因子、 β -转化生长因子、BMP 等^[1]。

目前尚未找到 BMSCs 的特异性标记物,通常以其较强的贴壁生长特性、不表达造血干细胞标记物 (如 CD14、CD34、CD45 等)、形态似成纤维样细胞、具有多向分化潜能等特征来辨认。由于 BMSCs 可表达内皮细胞、表皮细胞和肌细胞等的表面抗原,因此常用 SH2、SH3、CD29、CD44、CD71、CD90、CD106、CD120a、CD124 等来筛选骨髓间质干细胞^[1,3]。

2 治疗股骨头坏死的理论依据

股骨头坏死的发病除与各种原因引起的局部组织缺血以外,近期研究发现股骨头坏死的发病可能与成骨细胞及骨髓基质细胞的功能下降有关^[4,7]。Hernigou 等^[5]通过比较 41 例股骨头坏死 (特发性 11 例,激素性 14 例,酒精性 16 例) 和 33 例正常人及 34 例因骨折不愈合接受骨髓移植患者髂嵴部位造血干细胞和骨髓基质细胞的活性,发现股骨头坏死患者的造血干细胞和骨髓基质细胞的活性,较正常人均有明显降低。后来又比较了激素性和镰状细胞病股骨头坏死与正常人

股骨粗隆部骨髓基质细胞的活性,发现激素性股骨头坏死组的成纤维细胞集落形成单位数量较其他两组明显减少^[6]。Gangji 等^[4]比较了 13 例股骨头坏死和 8 例骨性关节炎患者粗隆部及髂嵴部成骨细胞的碱性磷酸酶活性及 1,25-羟维生素 D₃ 的敏感性和胶原合成水平,结果显示股骨头坏死患者粗隆部成骨细胞的增殖能力下降,作者认为粗隆部成骨细胞的功能改变是股骨头坏死的发病机制之一。最近有人比较了 33 例酒精性股骨头坏死和股骨颈骨折患者股骨近端骨髓间质干细胞的成骨和成脂肪分化潜能,结果酒精性股骨头坏死患者骨髓基质干细胞的成骨分化潜能显著降低^[7],这可能对酒精性骨坏死的发生发展有一定的作用。

Kocher 等^[8]通过实验证实骨髓干细胞或内皮前体细胞可以促进缺血模型的血流恢复,Kindt 等^[9]在给缺血性大鼠后肢肌肉注射培养的骨源性干细胞后,发现与血管生成有关的细胞因子 (如 VEGF、FGF-2、IL-6 等) 基因表达水平增高,并可以促进侧支循环及肢体功能恢复。BMSCs 可诱导分化为成骨细胞早已在体内外实验中得到证实^[1]。可见通过骨髓干细胞移植既有利于股骨头血供的恢复,又能提高成骨能力,从而促进坏死骨的修复,对早期股骨头坏死的治疗是有利的。

3 骨髓间质干细胞的采集与制备方法

骨髓间质干细胞的采集应在无菌条件下进行,可采用全麻或局麻,采集部位以髂前上棘为多。Gangji 等^[10]报道在全麻严格无菌条件下,患者仰卧位,在髂前上棘水平做 3 mm 切口,用手将穿刺针插入到髂嵴,用 10 ml 肝素化注射器抽取骨髓液,然后放入骨髓收集袋,共收集 400 ml,立即送到细胞与分子实验室进行过滤,除去骨屑、脂肪及细胞碎片,再用依次变细的系列滤网过滤,将收集的骨髓细胞装入无菌塑料包,用细胞分离器分类,并浓缩到 50 ml 备用。Hernigou 等^[11]也采用全麻下从髂前上棘抽取骨髓液的方法,不过用的是内径 1.5 mm,长 6~8 cm 斜面穿刺针,分段抽取,这样可以避免抽取过多的外周血。骨髓液经细胞分离器浓缩,400 g 离心 5 min 分离多核细胞,再以每分钟 100 ml 流速 40~50 s 分离出白细胞,无核的红细胞即位于中心部,并被血浆覆盖,剩余部分即为单个核细胞层,制成 30 ml 干细胞悬液,装入注射器备用。而国内杨晓凤等^[12]报告在局麻下从髂后上棘抽取骨髓,单侧骨

坏死采集骨髓 200 ml 双侧采集 400 ml 经 Ficoll 密度梯度离心, 分离单个核细胞, 制备成单个核细胞悬液 10~20 ml 备用。

4 骨髓干细胞的植入方法

目前骨髓干细胞植入方法有直接注入法和经动脉注入法 2 种。Hemigou 等^[11]报道在髓芯减压术后, 插入 1 个小套管针, 先注入少量造影剂, 再注入干细胞悬液, 以检查干细胞悬液可能扩散的区域, 他们认为造影剂不会干扰骨祖细胞的功能。Gangji 等^[10, 13-14]报道在髓芯减压术后经环钻注入干细胞悬液, 注射前常规做细菌和真菌培养以便进行质量控制。杨晓凤等^[12]采用经股动脉插管, 将导管送至股深动脉, 先行数字减影血管造影术, 然后将导管插入旋股内动脉、旋股外动脉及闭孔动脉, 分次缓慢将干细胞悬液注入动脉内。汪学松^[15]在病灶搔刮术后, 插入套管针, 从髂骨抽取自体红骨髓 10 ml 不做其他处理, 直接自套管针内快速加压注入坏死区。

5 骨髓干细胞治疗股骨头坏死的疗效

临床研究结果显示骨髓干细胞移植治疗股骨头坏死, 对缓解疼痛、改善关节功能、阻止病变进展有较好的作用。Hemigou 等^[11]应用骨髓干细胞移植治疗 116 例, 189 个髋, 随访 5~10 年, 平均 7 年, 结果塌陷前期 (I、II 期) 145 髋中只有 9 髋因病情进展需要行髋关节置换, 而塌陷后 (III、IV 期) 的 44 髋中有 25 髋需要做全髋关节置换。结果提示骨髓干细胞移植对早期股骨头坏死的疗效较好, 统计分析结果还显示移植的祖细胞数量越多, 疗效就会越好。Gangji 等^[13-14]比较了髓芯减压术加骨髓干细胞移植与单纯髓芯减压术治疗早期 (ARCO I - II 期) 股骨头坏死的疗效, 随访 24 个月, 结果骨髓干细胞移植组关节疼痛 VAS 评分由治疗前 37.8 ± 8.4 下降到 16.3 ± 6.8 ($P = 0.017$), 而对照组治疗前后无明显差异 ($P = 0.646$), 两组比较有统计学差异 ($P = 0.021$); Lequesne 指数由治疗前 7.7 ± 1.5 下降到 2.2 ± 1.0 ($P = 0.012$), 两组比较有统计学意义 ($P = 0.001$)。对照组 8 髋中 5 髋发展到 III 期, 骨髓移植组 10 髋中只有 1 髋发展到 III 期, 生存分析显示两组在 12、24 个月时差异有显著性意义 ($P = 0.038$ 和 0.016); 骨髓移植组骨坏死体积由 15.6% 下降到 10.1%, 对照组由 16.7% 增加到 20.6%, 两组比较差异有显著性意义 ($P = 0.001$)。提示髓芯减压术加骨髓干细胞移植治疗早期股骨头坏死的疗效明显优于单纯髓芯减压术。杨晓凤等^[12]采用经动脉骨髓干细胞移植治疗股骨头坏死 63 例, 结果关节疼痛缓解 54 例, 行走距离延长 34 例, 关节功能改善 19 例。6 个月时对其 5 例进行了数字减影血管造影检查, 显示旋股内动脉、旋股外动脉及闭孔动脉管径增粗, 新生血管增多, 血流速度增加, 与治疗前比较, 股骨头区血液供应明显改善。2 例 18 个月复查 X 线及 CT 显示股骨头坏死区缩小, 可见新骨形成。汪学松^[15]报道用自体骨髓移植治疗早期股骨头坏死 27 例, 结果大部分患者疼痛、关节功能、X 线均有不同程度改善。

6 存在的问题与展望

应用骨髓干细胞移植治疗股骨头坏死疗效已得到初步肯定, 但有关骨髓干细胞治疗股骨头坏死的临床疗效报道尚不多, 疗效评价标准和适应证的选择也没有统一标准, 尤其缺少大样本的随机对照研究。有报道认为所移植干细胞的数量越

多, 疗效越好^[11], 但目前对于移植干细胞的合适数量仍不清楚, 也不清楚最低需要移植多少干细胞才能达到有效的治疗, 移植过多会不会带来其他不良反应。对于移植细胞的生物学行为及其转归也了解甚少。关于骨髓干细胞的移植途径究竟是直接移植好, 或是经动脉移植好, 或是两者联合使用更好, 目前也没有研究报道。尽管目前尚有上述诸多问题没有解决, 但相信随着干细胞研究的不断深入和对骨髓干细胞分离纯化技术的进步, 通过临床应用不断积累经验, 骨髓干细胞移植将可能成为治疗股骨头坏死的有效方法。如果能应用其他方法来增强干细胞的活性, 将有利于进一步提高疗效。

参考文献

- 1 王廷华, 羊惠君, McDonald W. 干细胞理论与技术. 北京: 科学出版社, 2005 56-61
- 2 Nevo Z, Robinson D, Horowitz S, et al. The manipulated mesenchymal stem cells in regenerated skeletal tissues. *Cell Transplant* 1998, 7(1): 63-70
- 3 Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003 116(Pt9): 1827-1835
- 4 Gangji V, Hauzeur JP, Schoutens A, et al. Abnormalities in the replicative capacity of osteoblastic cells in the proximal femur of patients with osteonecrosis of the femoral head. *J Rheumatol* 2003 30(2): 348-351
- 5 Hemigou P, Beaujean F. Abnormalities in the bone marrow of the iliac crest in patients who have osteonecrosis secondary to corticosteroid therapy or alcohol abuse. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1997 79(7): 1047-1053
- 6 Hemigou P, Beaujean F, Lambotte JC. Decrease in the mesenchymal stem-cell pool in the proximal femur in corticosteroid-induced osteonecrosis. *J Bone Joint Surg (Br)*, 1999 81(2): 349-355
- 7 Suh KT, Kim SW, Roh HL, et al. Decreased osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in alcohol induced osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res* 2005 431: 220-225
- 8 Kocher AA, Schuster MD, Szabo KM, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001, 7(4): 430-436
- 9 Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004, 94(5): 678-685.
- 10 Gangji V, Hauzeur JP. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone marrow cells. Surgical technique. *J Bone Joint Surg (Am)*, 2005 87 (Suppl1): 106-112
- 11 Hemigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin Orthop Relat Res* 2002 405 14-23.
- 12 杨晓凤, 王红梅, 许亿峰, 等. 经动脉骨髓干细胞移植治疗股骨头坏死 63 例. *中国临床康复*, 2006 10(13): 3-5.
- 13 Gangji V, Toungouz M, Hauzeur JP. Stem cell therapy for osteonecrosis of the femoral head. *Expert Opin Biol Ther* 2005 5(4): 437-442
- 14 Gangji V, Hauzeur JP, Matos C, et al. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone marrow cells. A pilot study. *J Bone Joint Surg (Am)*, 2004 86-A(6): 1153-1160
- 15 汪学松. 经皮骨髓移植治疗早期股骨头坏死 27 例. *滨州医学院学报*, 2002 25(6): 435-436

(收稿日期: 2006-08-05 本文编辑: 李为农)