

· 基础研究 ·

血管束植入联合细胞移植治疗兔股骨头坏死模型的实验研究

陈双涛¹, 张卫平², 刘长安², 王俊江¹, 宋恒义¹, 柴志文¹

(1. 冀中能源邢台矿业集团总医院关节骨科, 河北 邢台 054000; 2. 解放军白求恩国际和平医院骨科, 河北 石家庄 050082)

【摘要】 目的: 探讨血管束植入联合同种异体骨髓基质干细胞移植治疗兔股骨头坏死骨缺损模型的可行性, 探索治疗股骨头坏死的一种新方法。方法: 36 只新西兰大耳白兔随机分成 A、B、C 3 组, 每组 12 只, 所有动物的双侧股骨头均参加实验。用液氮冷冻法造模, 股骨头钻孔造成骨缺损。A 组为空白对照组, B 组为同种异体骨髓基质干细胞移植组, C 组为同种异体骨髓基质干细胞移植联合血管束植入组。分别于术后 2、4、8、12 周处死 3 只实验动物。所获的股骨头标本分别做组织切片 HE 染色, 进一步测算股骨头冠状截面的血管密度及新生骨小梁在骨缺损区所占的面积百分比, 做统计分析。结果: C 组股骨头缺损区 2 周时可见新生骨小梁和原始毛细血管形成, 8 周时新生骨小梁板层状或编织状, 毛细血管丰富, 12 周时骨小梁变宽变粗, 排列规则, 可见成熟的骨小梁及新生骨髓。B、C 两组股骨头冠状截面的血管密度及新生骨小梁在骨缺损区所占的面积比, 2 周时差异无统计学意义, 4、8、12 周时 C 组股骨头冠状截面的血管密度及新生骨小梁在骨缺损区所占的面积比均比同时期 B 组大。结论: 体外培养的同种异体骨髓基质干细胞能在股骨头坏死骨缺损区形成新生骨小梁, 可以用作异体移植。植入股骨头坏死骨缺损区的血管束可以有效改善股骨头的血运, 促进新生骨小梁的形成。

【关键词】 干细胞, 骨髓; 股骨头坏死; 干细胞移植; 动物实验

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2013.03.013

Experimental study on vascular bundle implantation combined with cellular transplantation in treating rabbit femoral head necrosis CHEN Shuang-tao*, ZHANG Wei-ping, LIU Chang-an, WANG Jun-jiang, SONG Heng-yi, and CHAI Zhi-wen. *Department of Orthopaedics, Xingtai Mining Group General Hospital of Jizhong Energy Resources, Xingtai 054000, Hebei, China

ABSTRACT **Objective:** To discuss the feasibility of vascular bundle implantation combined with allogeneic bone marrow stromal cells (BMSCs) transplantation in treating rabbit femoral head osteonecrosis and bone defect, in order to explore a new method for the treatment of femoral head necrosis. **Methods:** Thirty-six New Zealand rabbits were randomly divided into three groups, with 12 rabbits in each group. Bilateral femoral heads of the rabbits were studied in the experiment. The models were made by liquid nitrogen frozen, and the femoral heads were drilled to cause bone defect. Group A was the control group, group B was stem cells transplantation group of allograft marrow stromal, and group C was stem cells transplantation group of allograft marrow stromal combined with vascular bundle implantation. Three rabbits of each group were sacrificed respectively at 2, 4, 8, 12 weeks after operation. All specimens of the femoral heads were sliced for HE staining. Furthermore, vascular density and the percentage of new bone trabecula of femoral head coronary section in defect area were measured and analyzed statistically. **Results:** In group C, new bone trabecula and original micrangium formed at the 2nd week after operation; new bone trabecula was lamellar and interlaced with abundant micrangium at the 8th week; at the 12th week, the broadened, coarsened bone trabecula lined up regularly, and the mature bone trabecula and new marrow were visible. At the 2nd week after operation, there was no statistical significance in the percentage of new bone trabecula of femoral head coronary section in defect area between group B and C. While at 4, 8, 12 week after operation, vascular density and the percentage of new bone trabecula of femoral head coronary section in defect area of group C was higher than that of group B. **Conclusion:** Allogeneic bone marrow stromal cells cultured in vivo can form new bone trabecula, and can be applied to allotransplant. Vascular bundle implanted into the bone defect area of femoral head necrosis could improve blood supply, and promote the formation of bone trabecula.

KEYWORDS Stem cells, myeloid; Femur head necrosis; Stem cell transplantation; Animal experimentation

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(3):223-226 www.zggszz.com

基金项目: 河北省科技支撑计划项目(编号: 2007SP075)

Fund program: Supported by Science and Technique Supporting Program of Hebei Province(No. 2007SP075)

通讯作者: 陈双涛 E-mail: chenshuangtao@126.com

股骨头缺血性坏死的治疗是一世界性难题。保存股骨头的姑息性治疗方法多种多样,但无论哪种方法其理论依据无非基于以下几点:改变股骨头的负重力线;降低骨内压;促进新骨的形成;改善或重建股骨头的血液循环。实践证明多种方法的联合应用效果要好于单一的方法。组织工程学的兴起,对骨髓基质干细胞及细胞因子研究的不断深入,为股骨头缺血性坏死的治疗提供了一个新的思路。本实验从促进新骨的形成、改善股骨头的血液循环入手,采用血管束植入联合同种异体骨髓基质干细胞移植的方法治疗股骨头缺血性坏死,旨在探索治疗股骨头坏死的一种新方法。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 选用成年新西兰大白兔 36 只(白求恩国际和平医院实验动物中心提供),雌雄不限,3、4 月龄,体质量 2.5~3.0 kg。随机分为 A、B、C 3 组,每组 12 只,所有动物的双侧股骨头均参加实验。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

1.2 同种异体骨髓基质干细胞移植前准备 穿刺新西兰大白兔髂后上棘,所获骨髓种植于 6 孔细胞培养板内,加入条件培养液 5 ml(15%胎牛血清,100 U/ml 青霉素钠,100 U/ml 链霉素,10 mmol/L β 甘油磷酸钠,10⁻⁸ mmol/L 地塞米松,50 mg/L 维生素 C),放入细胞培养箱中培养。培养箱温度 37℃,含 5%CO₂,100%饱和湿度。5 d 后首次换液,以后每 3 d 换液 1 次,用 0.25%胰蛋白酶及 EDTA 消化,原孔传代,条件培养液继续培养。细胞传至第 3 代,胰蛋白酶消化后获取细胞悬液,离心并弃上清,加入适量的细胞冻存液(10%二甲基亚砷,40% FBS,50% DMEM),调整细胞浓度为 0.5×10⁷/ml,分装到塑料冻存管,每管 1.5 ml,迅速移入 4℃冰箱,20 min 后移入-20℃冰箱,30 min 后移入-80℃冰箱过夜,隔日置入-196℃液氮罐中保存。7 d 后取出冻存管,立即在 37℃水浴中解冻,待细胞悬液融化后加入 10 倍量的 DMEM 低速离心,弃上清,加 15%FBS 的条件培养液继续培养。第 2 天换液,去除死亡细胞及未贴壁的细胞,之后每隔 2~3 d 换液 1 次。将长满瓶底的第 5 代骨髓基质干细胞消化离心,用培养液调成 4×10⁶/ml 细胞悬液,复合于 0.4 cm×0.3 cm×0.2 cm 的胶原蛋白海绵上。每块海绵含细胞悬液 50 μ l,共 20 万个细胞,在细胞培养箱中孵育 5 h 备用。

1.3 模型的制作、细胞移植及血管束的植入 脱去双侧下腹部及大腿的毛发,40 mg/kg 硫喷妥钠做腹腔注射麻醉。取仰卧位,固定四肢,消毒铺巾,髋关节前侧切口,依次切开皮肤、皮下,分离肌肉,切开关节囊,显露股骨头,保护周围组织,以液氮棉团冷冻股

骨头 8 次,约 3 min^[1]。用温生理盐水复温后,从股骨颈前内侧用直径为 3.5 mm 钻头向股骨头内钻入约 5 mm,穿透股骨头骺线,到达关节软骨下。A 组植入胶原蛋白海绵,B 组植入复合有同种异体骨髓基质干细胞的胶原蛋白海绵,C 组植入复合同种异体骨髓基质干细胞的胶原蛋白海绵,同时植入腹壁浅动、静脉束。C 组动物手术时,切口在原基础之上向内上方延伸,切开皮肤、皮下,将腹壁浅动静脉远心端结扎,游离时注意尽量保留血管周围组织,近心端解剖至股动脉分支处,长约 5 cm。向内下旋转,植入股骨头骨缺损区内,远心端用 7-0 号无创缝合线固定于关节软骨面上。然后将复合同种异体骨髓基质干细胞的胶原蛋白海绵植入骨缺损区,包绕血管束。

1.4 股骨头标本的制作和组织学观察 分别于术后 2、4、8、12 周处死 3 只动物。所获的股骨头标本分别做组织切片 HE 染色,采用北航病理图像分析系统对组织切片缺损区新生骨小梁的面积百分比及股骨头冠状截面血管密度进行测算,做统计分析。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析,定量资料先进行正态分布检验,对于正态分布资料用成组设计独立样本 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 股骨头标本的组织学观察 2 周标本:各组股骨头关节面稍毛糙,软骨细胞层变薄,头下骨小梁变细,骨陷窝空虚。A 组缺损区可见零星成骨细胞,纤维组织充填,在钻孔的边缘形成少量的类骨质及新生骨小梁;B 组和 C 组缺损区有大量的成骨细胞增生,新生骨小梁开始形成,并可见少量的浆细胞和淋巴细胞(图 1);C 组股骨头缺损区可见原始的毛细血管形成(图 2)。4 周标本:A 组股骨头缺损区边缘骨小梁有所增多;B 组股骨头缺损区有骨小梁及类骨质形成,但新生骨小梁及新生毛细血管均较 C 组稀少;B 组和 C 组股骨头缺损区的浆细胞和淋巴细胞明显减少,在骺线被破坏的部分可见新生骺板形成。8 周标本:A 组钻孔缺损区出现大量的骨髓组织;B 组股骨头缺损区有大量骨小梁形成,但骨小梁幼稚、稀疏、排列紊乱(图 3);C 组股骨头缺损区新生骨小梁板层状或编织状,毛细血管丰富,可见红细胞、血小板等结构(图 4),但修复尚不均匀;B 组和 C 组缺损区浆细胞和淋巴细胞少见。12 周标本:A 组股骨头缺损区充填大量骨髓组织及部分纤维组织,仅缺损区边缘形成少量的骨小梁及类骨质;B 组股骨头缺损区可见大量细小的骨小梁,排列不规则;C 组缺损区骨小梁变宽变粗(图 5),排列规则,可见成熟的骨小梁及新生骨髓(图 6)。

2.2 股骨头冠状截面的血管密度及新生骨小梁在骨缺损区所占的面积比 结果见表 1。B、C 两组股骨头冠状截面的血管密度及新生骨小梁在骨缺损区所占的面积比,2 周时差异无统计学意义;4、8、12 周 C 组股骨头冠状截面的血管密度及新生骨小梁在骨缺损区所占的面积比均比同时期 B 组大。

3 讨论

3.1 骨髓基质干细胞异体移植的可行性 近年来关于骨髓基质干细胞移植的实验研究虽然有了较大进展,但细胞移植实验多局限于自体移植方面^[2-3]。在异体移植方面的研究较少,而在异体移植的研究中又多是采用新生兔的骨髓基质干细胞。尽管自体细胞移植不存在免疫排斥反应方面的问题,但是自

体移植须开辟第二手术野,运作周期也比较长,难于在临床上推广应用。因而从长远看,异体细胞移植更具应用前景。

本实验研究了成年兔骨髓基质干细胞异体移植,取得了比较理想的结果。复合有同种异体骨髓基质干细胞的胶原蛋白海绵植入股骨头坏死骨缺损区后,2 周时可见少量淋巴细胞和浆细胞存在,4 周时明显减少,以后连续观察至 12 周炎性细胞消失;植入的同种异体骨髓基质干细胞存活且具有较强的成骨能力,2 周时即有新生骨小梁形成,移植物未被排斥。本实验初步证明了经过多次消化传代,冷冻复苏的同种异体成年兔骨髓基质干细胞可以用作移植,以修复股骨头坏死骨缺损。

表 1 不同时间点 B、C 两组股骨头冠状截面的血管密度和骨缺损区新生骨小梁所占面积比的比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab.1 Comparison of vascular density at coronal section of femoral head and the area ration of bone trabecula in defect area between group B and group C at different times($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	血管密度				面积比			
	2 周	4 周	8 周	12 周	2 周	4 周	8 周	12 周
C 组	14.57±1.34	19.83±1.96	22.56±2.49	23.38±2.03	0.324 9±0.027 5	0.507 2±0.053 7	0.624 5±0.059 6	0.652 8±0.047 9
B 组	13.96±1.58	16.47±2.13	18.14±2.67	19.75±2.84	0.298 8±0.031 4	0.419 3±0.048 5	0.541 8±0.061 1	0.579 4±0.055 2
t 值	0.720	2.840	2.970	2.250	1.530	2.980	2.370	2.460
P 值	0.487	0.017	0.014	0.029	0.157	0.014	0.039	0.034

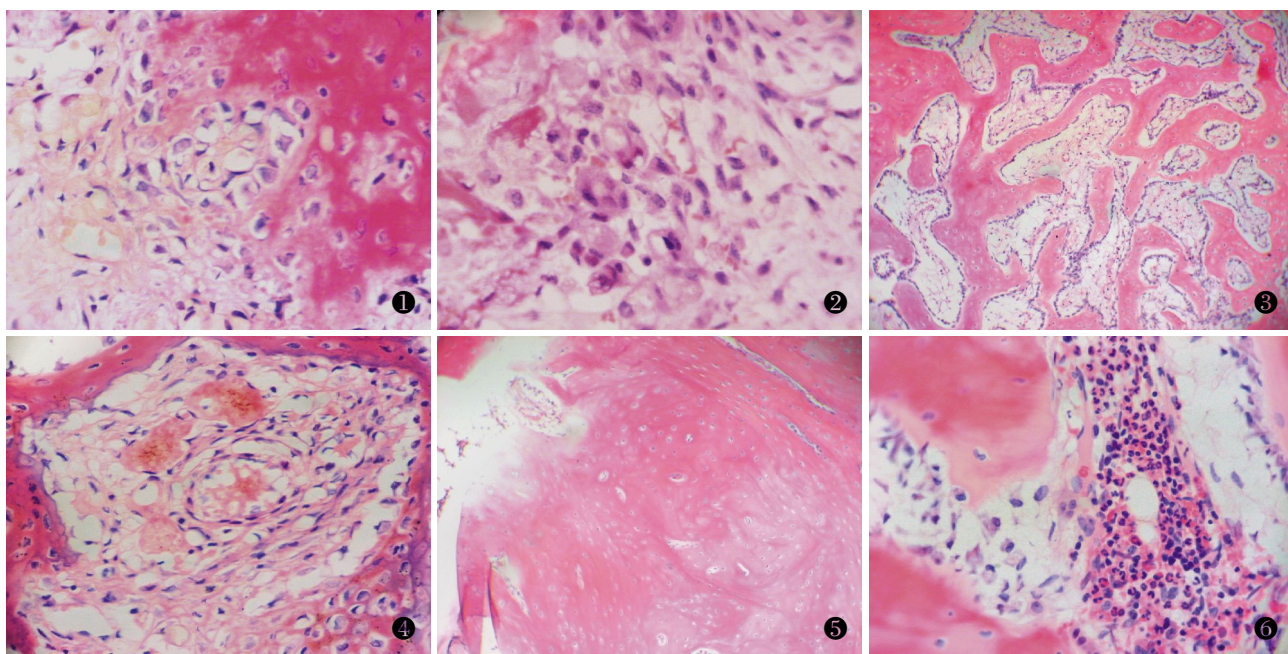


图 1 2 周时 A 组骨缺损区可见少量浆细胞和淋巴细胞(HE×400) 图 2 2 周时 C 组缺损区可见原始的毛细血管形成(HE×400) 图 3 8 周时 B 组缺损区有大量骨小梁形成,但骨小梁幼稚、稀疏、排列紊乱(HE×100) 图 4 8 周时 C 组缺损区毛细血管丰富,可见红细胞、血小板等结构(HE×400) 图 5 12 周时 C 组缺损区骨小梁变宽变粗(HE×400) 图 6 12 周时 C 组缺损区可见成熟的骨小梁及新生骨髓(HE×400)

Fig.1 A few plasmocytes and lymphocytes were found in bone defect area at the 2nd week after operation in group A (HE×400) **Fig.2** Primary microvessel formed in defect area at the 2nd week after operation in group C (HE×400) **Fig.3** Generous bone trabecula formed in defect area at the 8th week after operation in group B, but the bone trabecula were immature and sparse, its arrangement was indiscriminate (HE×100) **Fig.4** Affluent microvessels were found in bone defect area at the 8th week after operation in group C, with red blood cells and platelets (HE×400) **Fig.5** Bone trabecula broadened and coarsened in defect area at the 12th week after operation in group C (HE×400) **Fig.6** Mature bone trabecula and new bone marrow was found in defect area at the 12th week after operation in group C (HE×400)

异体骨髓基质干细胞之所以能够存活而不被排斥,在于细胞移植不同于组织及器官移植,产生免疫反应的成分仅为细胞本身,主要是位于细胞膜表面的 MHC I、II 类抗原,体外培养的细胞是一较为纯化的细胞系,经多次胰酶消化、传代,可使部分膜表面抗原受体丢失,从而降低其免疫原性;同时,超低温保存细胞可使细胞的免疫反应性降低。另外,骨髓基质成骨细胞分泌的多种生长调节因子对免疫细胞亦有调节作用。加上创伤刺激了 TGF-β 等活性因子的分泌,这些活性因子也具有抑制免疫排斥反应的作用^[3]。

3.2 血管束植入在股骨头坏死修复中的作用 血运重建是组织再生的基础,要获得组织工程化组织必须保证植入体内的种子细胞尤其是材料内部的种子细胞能够获得及时充分的营养。这又有赖于充足的血液供应和细胞与材料复合物内血供重建的程度和速度。因此进行细胞和材料复合物内血供的重建就成为组织工程由基础向临床应用的关键环节^[4]。

血管束植入的方法操作简单而有效,同时血管束植入也是治疗股骨头坏死的一种传统方法。胡优威等^[5]应用旋股外侧血管束植入法治疗成人股骨头无菌性坏死;何伟等^[6]应用旋股外侧动静脉的升支、横支组成多条血管束,经“V”形骨隧道植入股骨头治疗股骨头无菌性坏死均取得了满意效果。血管束植入治疗股骨头坏死虽然有效,但单纯血管束植入所提供的成骨效应因素有限,难以提供股骨头修复所需的机械支撑因素,不能有效预防股骨头塌陷。更多的学者倾向于血管束联合其他方法共同治疗股骨头坏死,比如血管束联合骨移植等。

在植入血管束的选择上,临床多选用旋股外侧动静脉或旋髂深血管。在动物实验研究中,田军等^[7]采用股深动脉植入加游离骨膜治疗兔股骨头坏死模型,取得满意效果。本实验选用了兔腹壁浅动静脉作为移植的血管束植入股骨头坏死骨缺损中,同样取得了理想的结果。从组织切片看,2 周时 C 组和 B 组在骨小梁的面积百分比上差异无统计学意义,但 C 组股骨头标本缺损区可见原始毛细血管形成。从 4 周标本开始,C 组的标本可见大量的毛细血管,而未植入血管束组与同期血管束植入组的标本相比,无论是新生的毛细血管还是新生的骨小梁,都要稀少。采用北航病理图像分析系统对 C、B 两组标本的冠状截面血管密度及新生骨小梁占缺损区的面积百分比进行测算,并进一步做统计分析,结果在 4、8、12 周时 C 组的冠状截面血管密度及新生骨小梁的面积比同期 B 组的都要大。

分析出现以上差异的原因可能有以下几点:一

是股骨头坏死骨缺损区植入腹壁浅动静脉束后,新生血管以出芽的方式呈放射性生长,形成新生血管网,改善了股骨头的血液循环,为所移植的细胞提供营养,促进了新骨的形成;二是丰富的毛细血管带入的有活性的成骨效应细胞有利于死骨吸收和新骨形成,血管束周围结蒂组织带进的部分胶原纤维也参与成骨活动。从而最大限度地起到了促进新骨形成,修复股骨头,防止塌陷的作用。

综上所述,经过冷冻复苏、多次消化传代、并向成骨细胞定向诱导的同种异体成年兔骨髓基质干细胞免疫排斥力弱,能在液氮冷冻股骨头坏死骨缺损区形成新生骨小梁,可用作异体移植。植入股骨头坏死骨缺损区的腹壁浅动静脉束可以有效改善股骨头血运,同时给所移植的细胞提供营养,促进新生骨小梁的形成。定向诱导的同种异体骨髓基质干细胞与腹壁浅动静脉束相辅相成,它们的联合应用可以快速、有效地修复股骨头坏死骨缺损。

参考文献

[1] 王江泳,王保芝,崔慧先,等.改良液氮冷冻法制备家兔股骨头坏死模型的实验研究[J].河北医科大学学报,2008,29(1):5-8. Wang JY, Wang BZ, Cui HX, et al. Morphological studies of femoral head necrosis model in rabbits established by improved freezing method with liquid nitrogen[J]. He Bei Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2008, 29(1):5-8. Chinese.

[2] Yan Z, Hang D, Guo C, et al. Fate of mesenchymal stem cells transplanted to osteonecrosis of femoral head[J]. J Orthop Res, 2009, 27(4):442-446.

[3] Grotendorst GR, Smale G, Pencev D. Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils[J]. J Cell Physiol, 1989, 140(2):396-402.

[4] Terheyden H, Jepsen S, Rueger DR. Mandibular reconstruction in miniature pigs with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1: a preliminary study[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 1999, 28(6):461-463.

[5] 胡优威,梁培雄,龚庆生.旋股外侧血管束植入法治疗成人股骨头无菌性坏死 34 例[J].湖南医学,1999,16:31-32. Hu YW, Liang PX, Gong QS. Vascular bundle implantation of lateral circumflex femoral was used in treating adult aseptic necrosis of femoral head[J]. Hu Nan Yi Xue, 1999, 16:31-32. Chinese.

[6] 何伟,袁浩,李雄,等.多条血管束植入治疗成人股骨头坏死的远期疗效观察(附 190 例 203 髋分析)[J].骨与关节损伤杂志,2000,15:261-263. He W, Yuan H, Li X, et al. Long-term effects of implantation of multi-bundles for adult avascular necrosis of femoral head[J]. Gu Yu Guan Jie Sun Shang Za Zhi, 2000, 15: 261-263. Chinese.

[7] 田军,陶天遵,杨林,等.兔股骨头缺血性坏死手术治疗方法比较[J].临床骨科杂志,2003,6(3):196-199. Tian J, Tao TZ, Yang L, et al. A comparative study on different surgical treatment of femoral head avascular necrosis in rabbit[J]. Lin Chuang Gu Ke Za Zhi, 2003, 6(3):196-199. Chinese.

(收稿日期:2012-10-18 本文编辑:连智华)