

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.27.002

髓芯减压联合骨髓间充质干细胞治疗早期股骨头坏死的病理学变化*

李磊¹, 郑怀亮¹, 寇玉², 张健³, 杨海韵³

(1. 河南省洛阳正骨医院/河南省骨科医院, 河南洛阳 471000; 2. 扬州大学医学院, 江苏扬州 225000;

3. 广州中医药大学附属佛山中医院 528000)

[摘要] **目的** 研究髓芯减压联合骨髓间充质干细胞对兔早期股骨头坏死的治疗作用。**方法** 将 48 只新西兰白兔分为 4 组: 空白组、模型组、髓芯减压组、髓芯减压联合骨髓间充质干细胞组。用液氮法构建兔股骨头坏死模型。运用病理学检测各组治疗情况, 检测空骨陷窝率、骨小梁面积比、脂肪细胞平均直径。**结果** 成功获得骨髓间充质干细胞, 兔股骨头坏死模型构建成功。髓芯减压联合骨髓间充质干细胞治疗效果优于髓芯减压组, 其治疗效果接近空白组。与模型组相比, 治疗组(髓芯减压组和髓芯减压联合骨髓间充质干细胞组)的骨小梁面积比、脂肪细胞平均直径和空骨陷窝率差异有统计学意义($P < 0.05$), 治疗有明显效果。其中髓芯减压联合骨髓间充质干细胞组的骨小梁面积比、脂肪细胞平均直径和空骨陷窝率分别是 $52.3\% \pm 3.5\%$ 、 $(35.1 \pm 3.6) \mu\text{m}$ 和 $12.8\% \pm 2.5\%$ 。**结论** 髓芯减压联合骨髓间充质干细胞治疗股骨头坏死具有显著疗效。

[关键词] 股骨头坏死; 髓芯减压; 骨髓间充质干细胞; 病理学变化

[中图分类号] R683

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)27-3490-04

Pathologic change of core decompression combined with implantation of bone mesenchymal stem cells in treating early femoral head necrosis*

LI lei¹, ZHENG Huailiang¹, KOU Yu², ZHANG Jian³, YANG Haiyun³

(1. Luoyang Bonsetting Hospital/ Henan Provincial Orthopedic Hospital, Luoyang, Henan 471000,

China; 2. Medical College, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225000, China;

3. Affiliated Foshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 528000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the curative effect of core decompression combined with implantation of bone marrow mesenchymal stem cell (BMMSCs) on rabbit early stage femoral head necrosis. **Methods** Forty-eight healthy New Zealand rabbits were randomly and equally divided into 4 groups: blank group, model group, core decompression group and the core decompression combined with BMMSCs implantation. The early rabbit femoral head necrosis model was constructed by the liquid nitrogen method. The treatment situation in each group was examined by using the pathological method, including empty bone lacunae rate, bone trabecular area ratio, and the average diameter of fat cells. **Results** The bone marrow mesenchymal stem cell was achieved from rabbits and purity was higher. The model of early necrosis of rabbit's femoral heads was successfully constructed. The best treatment method was core decompression combined with implantation of bone marrow mesenchymal stem cell compared with core decompression at early necrosis of femoral heads. Core decompression and core decompression combined with implantation of bone marrow mesenchymal stem cell Group compared with the model the area ratio of bone trabeculae was significantly increased while the average diameter of adipocyte cells and the rate of empty bone were significantly decreased. And the area ratio of bone trabeculae, the average diameter of adipocyte cells and the rate of empty bone were $52.3\% \pm 3.5\%$, $(35.1 \pm 3.6) \mu\text{m}$ and $12.8\% \pm 2.5\%$, respectively. **Conclusion** The core decompression combined with BMMSCs implantation for treating femoral head necrosis has significant effect.

[Key words] femur head necrosis; core decompression; bone marrow mesenchymal stem cell; pathologic change

早期股骨头坏死的治疗多选用保留股骨头外形 的髓芯减压手术。骨是一个相对密闭的环境, 由骨皮

质包绕形成,很多种因素都可引起该密闭空间的压力升高,当骨内压升高时会压迫骨内的血管,阻碍骨内微循环,导致骨微观结构的血液供应不足^[1]。在股骨头坏死的早期,通过钻孔减压使骨内密闭环境开放,打通了骨内微循环,静脉血的回流增强,骨髓水肿减轻,骨内微观结构空间增加,形成了良性微循环,改善了宏观股骨头颈内的血液循环,创造了促进坏死骨吸收、新骨形成的良好条件。最近,TRAISTARU 等^[2]开展了一项关于患者的成像和组织病理学方面的相关性的回顾性研究,认为组织病理学是患者精确治疗阶段中一个关键的角色。髓芯减压目前仍然被认为是一种有争议的技术^[3-4]。有研究通过动脉灌注骨髓干细胞治疗新西兰兔股骨头坏死,结果显示:发生病变的股骨头内血管被骨髓干细胞疏通,骨髓干细胞能够改善股骨头坏死区及周围组织的血液循环,促进血管再生。

本研究采用髓芯减压联合骨髓间充质干细胞治疗早期股骨头坏死,通过检测空骨陷窝率、骨小梁面积比、脂肪细胞平均直径来量化治疗效果。探讨髓芯减压联合骨髓间充质干细胞治疗股骨头坏死的病理变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取 2 只 SPF 级健康 1 周大新西兰白兔(购自南方医科大学动物实验中心)纳入本实验研究,用于提取骨髓间充质干细胞,体质量 0.5~0.8 kg。选取 48 只 SPF 级健康成年新西兰白兔纳入本实验研究,雌雄各半,体质量 2.5~3.0 kg,采用颗粒饲料单笼饲养。

1.2 构建兔股骨头坏死模型及分组 随机选取 12 只新西兰白兔为空白对照组,其余动物用液氮法构建股骨头坏死模型。术后 2 周随机抽取 3 只实验兔,行 X 线、螺旋 CT、HE 染色等检测,证实造模是否成功。造模成功后将造模白兔分为模型组、髓芯减压组、髓芯减压联合骨髓间充质干细胞组,每组各 12 只。

1.3 骨髓间充质干细胞培养 将骨髓间充质干细胞培养瓶放入 37℃,含 5% CO₂ 的孵箱中培养 5~7 d,每天在倒置相差显微镜下观察细胞的生长状态、瓶中培养基色泽并照相,根据培养基色泽及细胞状态决定是否需要换液,一般是 48 h 后首次换液,吸出培养液,PBS 液冲洗 2 遍,弃去未贴壁细胞,更换新鲜的 L-DMEM 培养液,一般 48~72 h 换液 1 次。

1.4 髓芯减压术及注射干细胞的步骤 取新西兰白兔称质量后,采用 1 mL 一次性无菌注射器依次取 3% 戊巴比妥钠注射液 0.5 mL/kg、速眠新 II 0.1 mL/kg 混合后经兔耳后缘外侧的耳静脉注射麻醉,采用右侧卧位,以右股骨大转子为中心,用生理盐水湿润毛发后以弯组织剪紧贴皮肤剪除毛发,半径约 5 cm,予碘伏消毒皮肤、备皮。常规无菌操作下,取大转

子下缘约 1 cm 纵向切口,暴露骨膜,便携式手提 X 线机透视下用电转安装直径 1 mm 的定位针,以大转子下缘外侧为进针点,沿股骨颈中央向股骨头中心方向转入,有落空感后继续推进,到底后硬化带低速磨转,直至尖端达关节面下约 0.5 cm,然后用直径 1 cm 空心钻套入定位针全段扩髓,退出空心钻,拔出定位克氏针,用骨蜡封口,逐层缝合。注射干细胞时,沿股骨颈中央向股骨头中心方向转入,有落空感后继续推进,到底后硬化带低速磨转,直至尖端达关节面下约 0.5 cm,然后用直径 1 cm 空心钻套入定位针全段扩髓,退出空心钻,拔出定位针的同时插入 5 mL 一次性无菌注射器针头,此时出血较多,取出在 -20℃ 下预冷的 1 mL 一次性无菌注射器和套管针,在 4℃ 冰箱里快速吸取骨髓干细胞和基质胶混合物,原放置注射器尽量吸干骨髓道里积血后,套管针插至骨髓道最深处缓慢向股骨头内注入干细胞混合物,内含成骨细胞约 200 万个,去除 1 mL 注射器后用套管针针芯再次推入防止干细胞残留在套管针内壁,拔除套管针的同时以骨蜡堵塞骨髓道,用骨蜡封口,股骨头颈倒置位保持 10 min 至基质胶凝固定位,缝合术口。

1.5 影像学观察 实验动物造模后 2 周随机抽取 3 只,经检测证实股骨头坏死模型制备成功,分别行单纯髓芯减压术、髓芯减压+骨髓间充质干细胞移植修复术。各组至股骨头坏死模型制备成功后 2、4、8 周分别随机抽取 3 只实验兔检测,方法如下:采用 1 mL 一次性无菌注射器依次取 3% 戊巴比妥钠注射液 0.5 mL/kg、速眠新 II 0.1 mL/kg 混合后经兔耳后缘外侧的耳静脉注射麻醉,俯卧位放置 X 线摄像或 CT 床,保持双侧髓关节外展,稍后伸,采用耳蜗模式扫描双侧兔髓关节,采集图像,了解股骨头坏死修复情况。

1.6 病理学观察 获取治疗 8 周的各组实验动物的股骨头,置于体积分数 10% 甲醛溶液中固定 24 h,5% 稀硝酸脱钙 3~5 d,系列乙醇脱水,常规石蜡包埋,切片苏木素-伊红(HE)染色,显微镜观察空骨陷窝率(empty bone lacunae rate,EBLR,每高倍视野空骨陷窝数与骨细胞数比值,计数 3 个空骨陷窝较多视野,取其平均值)、骨髓脂肪细胞平均直径及骨小梁面积比等组织学特征。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞的培养 兔原代细胞提取种入带完全培养基的 25 cm 培养瓶中,将细胞培养瓶放入 37℃,含 5% CO₂ 的孵箱中培养 4 h,用倒置相差显微镜观察即可发现圆形的悬浮细胞开始部分聚集,细胞呈梭形,集结于平底(图 1),随着时间推移,贴壁生长的细胞数量逐渐增多,培养 7 d 后(期间据培养基色泽及细胞状态决定是否需要换液),贴壁梭形细胞生长融合率达 90% 以上,没有或有极少悬浮单个细胞存在。贴壁细胞形态均一,呈长梭形旋涡状生长。

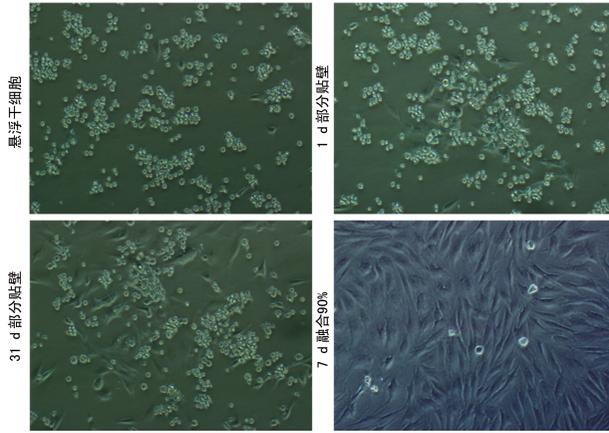


图 1 不同时间骨髓间充质原代细胞形态学观察(×200)

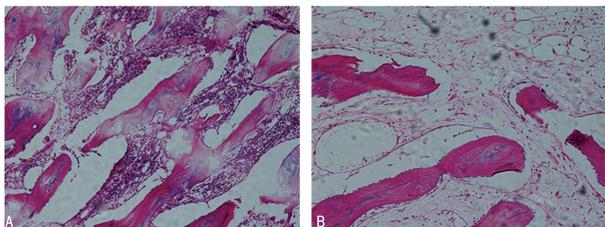
2.2 兔股骨头坏死模型构建结果

2.2.1 X线影像学结果 造模后 2 周左侧股骨头密度明显增高,但无法辨别钻孔隧道(图 2)。



图 2 兔膝关节正位 X 线片

2.2.2 病理学结果 造模后 2 周随机选取模型组兔子和空白组兔子各 1 只行股骨头病理切片,证实股骨头坏死模型造模成功(图 3)。空白组:骨小梁排列整齐,无变细,造血组织无减少,空骨陷窝少见;模型组:骨小梁变细、稀疏、部分断裂,造血组织减少,空骨陷窝增加,脂肪细胞增多。

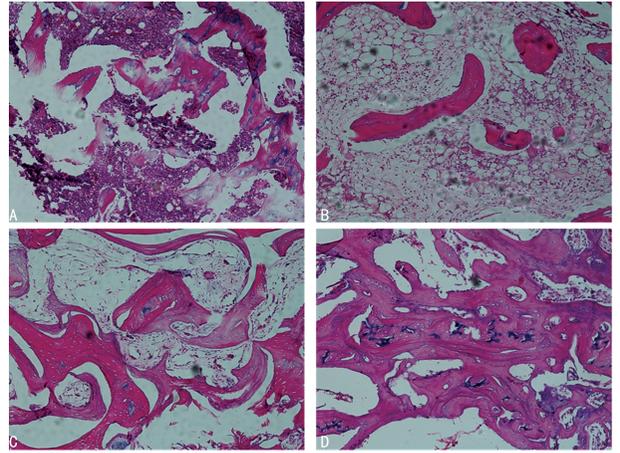


A:空白组;B:模型组

图 3 空白组与模型组病理图片(HE×100)

2.3 各组治疗 8 周后病理学结果 空白组:股骨头骨小梁结构、形态完整,骨小梁中的骨细胞清晰可见,周围成骨细胞丰富,空骨陷窝少见,骨髓腔内造血细胞丰富,形态正常,脂肪细胞与造血组织比例均匀。模型组:股骨头骨小梁变细,间距增大,结构紊乱,部分有断裂现象,脂肪细胞数增多,空骨陷窝数明显增加。髓芯减压组:与模型组相比,骨小梁粗大,排列

规则,骨髓腔内造血细胞增多,脂肪细胞数有所减少,骨细胞部分恢复正常,空骨陷窝明显减少。髓芯减压联合骨髓间充质干细胞组:与模型组相比,骨小梁基本恢复正常,排列规则,骨髓腔内造血细胞增多,脂肪细胞数减少,骨细胞大部分恢复正常,空骨陷窝明显减少(图 4、表 1)。



A:空白组;B:模型组;C:髓芯减压组;D:髓芯减压联合骨髓间充质干细胞组

图 4 不同治疗组治疗 8 周后兔股骨头病理图片(HE×100)

表 1 4 组骨小梁面积比、空骨陷窝率、脂肪细胞平均直径比较(±s)

组别	骨小梁面积比 (%)	空骨陷窝率 (%)	脂肪细胞平均直径(μm)
空白组	57.3±3.9	11.25±2.1	32.5±3.8
模型组	25.4±2.7	25.7±3.2	57.7±3.5
髓芯减压组	42.8±3.2	16.2±2.9	39.8±4.1
髓芯减压联合骨髓间充质干细胞组	52.3±3.5	12.8±2.5	35.1±3.6

2.4 骨小梁面积比、空骨陷窝率、脂肪细胞平均直径 与空白组相比,髓芯减压组及髓芯减压联合骨髓间充质干细胞组骨小梁面积比处于较高水平,髓芯减压联合骨髓间充质干细胞组与空白组更为接近,两组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。模型组骨小梁面积比处于较低水平($25.36\% \pm 2.7\%$),与空白组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。另外与模型组相比,髓芯减压组和髓芯减压联合骨髓间充质干细胞组骨小梁面积比部分恢复,差异有统计学意义($P<0.05$)。髓芯减压联合骨髓间充质干细胞组与空白组骨髓腔中空骨陷窝率均处较低水平($12.8\% \pm 2.5\%$ vs. $11.25\% \pm 2.1\%$),两组间差异无统计学意义($P>0.05$)。髓芯减压组空骨陷窝率有所下降,与空白组相比差异不明显。与模型组相比,髓芯减压组和髓芯减压联合骨髓间充质干细胞组的空骨陷窝率差异有统计学意义($P<0.05$)。与空白组相比,模型组脂肪细胞平均直径明显升高($P<0.05$),脂肪细胞平均直

径为 $(57.7 \pm 3.5) \mu\text{m}$ 。髓芯减压组和髓芯减压联合骨髓间充质干细胞组与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

3 讨 论

股骨头坏死是一种骨科常见病,由创伤、激素、乙醇等多种病因所造成。儿童的骨骼发育尚未成熟,其股骨头坏死的临床症状及病理生理过程不同,被称为 Perthes 病 (legg calve perthes disease, LCPD)。近年来,该病发病率不断增高,且发病年龄明显减小,患者患肢功能严重下降。在美国,每年新增 20 000 ~ 30 000 例患者,并且占到全髋置换手术的 5% ~ 18%,因而引起越来越多的国内外学者重视。

改善股骨头血供,提高髋关节功能,延缓坏死股骨头塌陷,成为治疗早期股骨头坏死的关键措施。髓芯减压术为治疗早期股骨头坏死的微创手术方法之一,临床效果肯定^[5]。但是,治疗早期股骨头坏死有很多种方法,从传统的髓芯减压、旋转截骨术、人工支架到生长因子,这些方法都不能完全保护股骨头和避免股骨头崩塌^[6]。因此,为了较好修复坏死骨组织,增加股骨头内血运供应,促进新骨形成,在传统髓芯减压术基础上,增加骨髓间充质干细胞移植,将能更好地治疗早期股骨头坏死。骨髓间充质干细胞移植是近年来研究治疗股骨头坏死方法的热点,研究认为骨髓干细胞具有多向分化潜能,在特定理化条件和细胞因子的作用下,有向成骨细胞分化的能力,促进骨修复^[7]。经证实,含有骨髓间充质干细胞的骨细胞衍生细胞可提供成骨细胞并促进骨形成^[8]。

本研究通过体外培养骨髓间充质干细胞得到较纯的干细胞后经髓芯减压联合干细胞移植进行治疗。本研究通过液氮法进行兔股骨头坏死模型的造模来进行不同组治疗效果的比较,实验分组为空白组、造模组、髓芯减压组、髓芯减压联合骨髓间充质干细胞组。体外培养骨髓间充质干细胞结果显示,通过体外培养可见纯度 90% 以上的骨髓间充质干细胞,可以用于骨髓间充质干细胞的移植。股骨头坏死病理学研究报道已有较多。早在 1973 年,ARLET 等根据镜下病理学表现将股骨头坏死分为 4 期:1 期为骨髓造血功能消失,被水肿或出血及脂肪细胞所分离,出现泡沫细胞;2 期为骨髓内脂肪细胞坏死,造血性骨髓变为颗粒状;3 期为骨髓和骨小梁完全坏死;4 期为骨髓纤维化密集,坏死骨小梁上出现新生骨小梁^[9]。本研究结果显示:与模型组相比,髓芯减压组有明显治疗效果,表现为骨小梁面积比增加,空骨陷窝率减少,脂肪细胞直径减少。但与空白组相比还存在明显差异。髓芯减压联合骨髓间充质干细胞组治疗效果较髓芯

减压组更为明显,与空白组更为接近,与空白组相比差异无统计学意义。

综上所述,经过体外提取及培养可以获得较高纯度的骨髓间充质干细胞并用于治疗股骨头坏死。髓芯减压和髓芯减压联合骨髓间充质干细胞对兔股骨头坏死具有治疗作用,而后者治疗作用更为明显。

参考文献

- [1] XIE X H, WANG X L, HE Y X, et al. Promotion of bone repair by implantation of cryopreserved bone marrow-derived mononuclear cells in a rabbit model of steroid-associated osteonecrosis[J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(5): 1562-1571.
- [2] TRAISTARU M R, KAMAL D, KAMAL K C, et al. Imaging and histopathological aspects in aseptic osteonecrosis of the femoral head[J]. *Roman J Morphol Embryo*, 2015, 56(4): 1447-1453.
- [3] MONT M A, CHERIAN J J, SIERRA R J, et al. Non-traumatic osteonecrosis of the femoral head; where do we stand today? a ten-year update[J]. *J Bone Joint Surg Am Vol*, 2015, 97(19): 1604-1627.
- [4] SADILE F, BERNASCONI A, RUSSO S, et al. Core decompression versus other joint preserving treatments for osteonecrosis of the femoral head: a meta-analysis[J]. *British Med Bul*, 2016, 118(1): 33-49.
- [5] MARKER D R, SEYLER T M, ULRICH S D. Do modern techniques improve core decompression outcomes for hip osteonecrosis[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2008, 466(5): 1093-1103.
- [6] WANG T, WANG W, YIN Z S. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with thorough debridement, bone grafting and bone-marrow mononuclear cells implantation[J]. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 2014, 24(2): 197-202.
- [7] 朱兵, 孙天胜, 周俊, 等. 自体骨髓间充质干细胞移植治疗早期股骨头缺血性坏死 44 例[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(45): 8516-8520.
- [8] FAN L, ZHANG C, YU Z, et al. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and osteogenesis in rabbit femoral head osteonecrosis[J]. *Bone*, 2012, 46(3): 635-645.
- [9] CHERNETSKY S G, MONT M A, LAPORTE D M, et al. Pathologic features in steroid and nonsteroid associated osteonecrosis[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1999(368): 149-161.

(收稿日期:2018-01-20 修回日期:2018-04-06)