

骨髓间充质干细胞移植治疗骨科疾病的研究进展

郭卫春 唐冰 熊敏 李军 曾云

【摘要】 目的 对骨髓间充质干细胞的生物特性、移植治疗各类骨科疾病的最新进展及可能的作用机制进行综述。**方法** 通过阅读相关文献,归纳整理骨髓间充质干细胞的生物特性及其在治疗骨科疾病中的应用与进展,分析其作用机制。**结果** 骨髓间充质干细胞的鉴定尚无一个明确有效的标准,其作用机制仍不十分明确。近年来在骨髓间充质干细胞移植治疗骨科疾病方面取得较多成果,具有重要的临床意义和广阔的研究前景。**结论** 骨髓间充质干细胞易于获取和分离培养,可快速扩增,具有多向分化潜能,为骨科疾病的治疗提供了广阔的应用前景。

【关键词】 骨髓间充质干细胞;移植;骨科;综述文献

近年来,随着干细胞技术的发展,利用干细胞移植治疗各类疾病取得了较大的突破,有些技术已经较为成熟。干细胞移植正在成为临床治疗的一种崭新手段。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs),是干细胞家族的重要成员,由于其来源广泛,易于分离培养,并且具有较强的分化潜能和可自体移植等优点,被认为是即将应用于临床的最优干细胞。BMSCs 移植治疗各种骨科疾病的研究也取得了较大进步,正在成为继常规保守治疗或手术治疗后一种全新的治疗方法。因此,探索 BMSCs 移植治疗各类骨科疾病具有重要的临床意义和广阔的研究前景。

一、BMSCs 的生物特性

BMSCs 最早由 Fridenstein 等^[1]在 20 世纪 70 年代中期发现。其主要存在于骨髓腔的内腔面,骨髓中 BMSCs 的含量极少,约占骨髓中有核细胞的 1/10 万^[2]。在体外培养中, BMSCs 具有较强的分化增殖能力和良好的生物学活性,而且易于分离获取^[3]。有文献报道 BMSCs 在体外分裂(38±4)次,仍具有分化潜能^[4]。在合适的环境和诱导下, BMSCs 不但可分化为造血细胞,还可分化为肌细胞、肝细胞、成骨细胞、成软骨细胞、神经细胞等^[5]。研究发现 BMSCs 表达的相对特异性表面抗原 CD105(+)、CD73(+)和 CD90(+) ^[6],但是 BMSCs 没有特定的表面标志,不同来源和不同扩增方法得到的 BMSCs 可能存在差异。为了解决这个问题,国际间充质干细胞暨细胞疗法委员会对 BMSCs 的定义设定了最低标准^[6]。该标准包括遵循可塑性、特定的表面抗原表达[CD73(+)/CD90(+)/CD105(+)/CD34(-)/CD11b(-)/CD14(-)/CD19(-)/CD79a(-)/CD14-HLA-DR-]以及在体外多向分化潜能。

二、BMSCs 移植治疗各类骨科疾病的研究进展

BMSCs 可以向成骨细胞、成软骨细胞、神经细胞转化的特性,为治疗各类骨科疾病提供了新的思路。大量研究表明 BMSCs 移植为骨科疾病的治疗,尤其是某些难治性疾病如脊髓损伤提供了新的解决办法。

(一)脊髓损伤

脊髓损伤是一种以损伤平面以下运动、感觉功能完全丧失和大小便功能失禁为主要临床表现的中枢神经系统严重创伤^[7]。传统观念认为,人发育成熟后神经系统不再具有再生和修复能力,如果出现损伤,神经系统相应结构和功能无法恢复。然而,大量研究证明, BMSCs 移植治疗能有效修复损伤脊髓,使神经功能的恢复及神经再生成为可能。Sakai 等^[8]应用 BMSCs 移植治疗脊髓损伤的动物模型,动物步态在移植 1 周后获得明显改善。5 周后取病变脊髓进行组织学检查,发现有新生神经纤维束穿过移植区和瘢痕组织区。Zurita 等^[9]也发现严重脊髓损伤的截瘫小鼠,在应用 BMSCs 移植治疗数周后运动功能明显好转,1 年后几乎完全恢复。且在病变间隙观察到再生的神经元细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞。有文献报道从猕猴体内提取 BMSCs 进行体外培养,2 周后将体外培养的 BMSCs 植入同种猕猴的 SCI 模型中,采用 RT-PCR 转基因法,在移植后 1、3、5 h 检测到新生细胞中特异性的 GAD65 和 GAD67,从而证实 BMSCs 可分化为神经细胞,促进神经功能的恢复^[10]。

国际上利用 BMSCs 移植治疗脊髓损伤已有相关的临床试验报道。Park 等^[11]对 5 例急性完全性脊髓损伤的患者进行 BMSCs 移植治疗,将自体 BMSCs 直接注射到损伤部位,且在治疗后每个月前 5 天进行一定量的粒巨细胞集落刺激因子注射,通过 6~18 个月的随访观察发现,5 例患者的运动和/或感觉功能均有明显改善, MRI 检查提示损伤处的脊髓体积稍增大,相邻断裂的脊髓有连接形成,提示骨髓完整性及神经功能通路的恢复。

李志营等^[12]对 78 例完全性脊髓损伤患者进行自体 BMSCs 联合周围神经移植治疗,除 1 例因严重复合伤患者

doi:10.3969/j.issn.1674-8573.2014.02.020

作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院骨科(郭卫春、唐冰、李军);湖北医药学院附属东风总医院骨科(熊敏、曾云)

通信作者:熊敏, E-mail: xiongmin1964@163.com

出现并发症死亡,6 例慢性完全性脊髓损伤患者无变化外,其他患者术后 ASIA 评分均较术前提高,在运动、感觉、影像学、神经电生理方面均获得不同程度的改善。

(二) 股骨头坏死

由于股骨头坏死的发病机制还未完全明确,因此尚无有效的方法可以促进坏死股骨头的修复。近年来,通过 BMSCs 移植治疗早期股骨头坏死已经成为一种可选的方法^[13],刘长安等^[14]利用液氮冷冻法制成兔股骨头坏死模型,然后随机分为两组,均行髓芯减压钻孔,对照组行单纯明胶海绵植入,实验组行复合有自体 BMSCs 的明胶海绵颗粒植入,术后行 X 射线和组织学检查,结果显示术后 2 周实验组钻孔区即可见大量的成骨细胞生成,4 周后钻孔区充满新生骨小梁结构,8 周后可见骨小梁成熟,并有骨髓组织填充;而对照组在术后 8 周才可见钻孔处边缘有散在的骨小梁形成。Gangji 等^[15]对 I、II 期 13 例(18 髋)股骨头坏死患者分别行单纯髓芯减压和髓芯减压加 BMSCs 移植,发现 BMSCs 移植组患者疗效明显优于单纯髓芯减压组。杨晓凤等^[16]运用 DSA 介入技术,经动脉注入 BMSCs 治疗兔股骨头坏死动物模型,4 周后发现实验组兔股骨头区供血动脉明显多于对照组,股骨头软骨、板层骨及骨小梁在干细胞移植后 12 周有明显修复。有研究者通过患侧旋股内、外动脉及闭孔动脉注入自体 BMSCs 治疗股骨头坏死患者 5 例,治疗后随访 1 年,结果显示 5 例患者的相关临床症状均得到明显缓解,髋关节 Harris 评分显著提高,但髋关节活动度无明显改变,未见严重并发症^[17]。

(三) 椎间盘退变

椎间盘退行性疾病是一类高发病率和高致残率的疾病^[18],也是造成腰腿痛的重要原因。实验证明细胞凋亡^[19]和细胞衰老^[20]是导致椎间盘功能细胞数量减少以及力学结构发生改变的主要原因。BMSCs 移植为退变椎间盘的细胞重建及功能恢复提供了一种全新的治疗策略,已显示出巨大潜能。Richardson 等^[21]在壳聚糖-甘油磷酸酯凝胶中植入 BMSCs,于体外复合培养 4 周,对比发现培养后 BMSCs 的基因表型与髓核细胞和关节软骨细胞的标记基因相似,且 BMSCs 分泌的蛋白多糖和胶原的量更接近髓核细胞。Sobajima 等^[22]在新西兰白兔退变的椎间盘内注入 BMSCs,24 周后取椎间盘组织行病理切片检查,结果证实植入的 BMSCs 存活并转移至纤维环内;因此证明 BMSCs 可以用于椎间盘退行性疾病的治疗。Orozco 等^[23]利用 BMSCs 髓核内植入治疗 10 例下腰痛患者,治疗后随访 1 年,10 例患者腰痛改善明显,生活质量显著提高,证实了 BMSCs 治疗下腰痛的可行性与安全性。

(四) 骨缺损

国内外学者对 BMSCs 复合生物材料治疗骨缺损进行了大量的实验研究。Livingston 等^[24]将培养扩增后的 BMSCs 与支架材料复合用于修复犬骨缺损,8 周后骨缺损区可见相当量的新骨形成,且支架周围也有大量新骨生成,形成跨缺损区的一个骨连续带;16 周后骨缺损逐渐修复,这充分证明

了 BMSCs 修复骨缺损的能力。刘阳等^[25]将兔股骨髓处形成一直径为 7 mm、深度为 10 mm 的骨缺损空腔,然后植入富集 BMSCs 的复合纳米羟基磷灰石/壳聚糖,12 周后发现富集 BMSCs 的纳米羟基磷灰石/壳聚糖对股骨缺损修复效果较单纯纳米羟基磷灰石/壳聚糖凝胶效果好。有报道在无胸腺小鼠的股骨缺损部位植入复合人 BMSCs 的陶瓷物^[26]。植入 12 周后发现载有人 BMSCs 的陶瓷植入物组可实现完全性骨连接,而无人 BMSCs 的陶瓷植入物组只是在骨与陶瓷的邻接部位才出现骨重建,该项研究证实人 BMSCs 能用于骨缺损的再生修复。

(五) 坐骨神经损伤

目前关于 BMSCs 移植治疗坐骨神经损伤的报道还只见于动物试验。Sakai 等^[27]通过 BMSCs 移植治疗坐骨神经损伤的大鼠模型,坐骨神经再生的机能评价采用坐骨神经功能指数(sciatic function index,SFI)表达,10 周后观察到大鼠腓肠肌重量下降情况明显好于对照组,且可记录到肌动作电位,受损的传导潜伏期改善,移植组坐骨神经损伤区域再生神经组织多于对照组。以上结果显示 BMSCs 可促进坐骨神经再生。

三、BMSCs 移植治疗各类骨科疾病的可能机制

(一) 分化和再生潜力

BMSCs 具有自我更新和分化成间叶细胞的能力,包括脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞、骨骼肌细胞和内脏中胚层细胞^[28]。此外,一些研究表明 BMSCs 的分化潜能超出传统的中胚层的谱系,还可以分化成外胚层和内胚层起源细胞,如肝细胞、神经细胞、心肌细胞^[29]等。有文献报道把 BMSCs 与小脑细胞一起培养,一段时间后发现在 BMSCs 表面分化出神经元的特异性 nestin 标记物。BMSCs 和小脑的神经元之间有突触连接,允许外界的信号传导到神经元内^[30]。然而,由于缺乏特定的 BMSCs 标记,目前仅有极少的资料来介绍 BMSCs 的体内分化,其相关作用机制仍有待进一步阐明。

(二) 迁移能力

大量研究表明,BMSCs 能够迁移到神经损伤病灶。张化彪等^[31]通过侧脑室、颈动脉将 BMSCs 移植到脑损伤的大鼠,1 周后在大鼠脑部海马区、缺血灶等处发现移植的 BMSCs,且分化为神经细胞。

(三) 分泌神经营养因子

大量研究证实,BMSCs 具有神经保护功能,是因为其可分泌多种神经营养因子,且对中枢神经系统源性神经生长因子的分泌具有促进作用。Zhou 等^[32]利用十字胞碱诱导胎鼠脑海马神经凋亡,再通过 BMSCs 移植治疗,发现胎鼠脑海马神经凋亡显著减少,证明 BMSCs 具有明显的神经保护作用。同时在此过程中观察到相关蛋白酶磷酸化增加,当使用特异性抑制剂进行阻断后,BMSCs 的神经保护作用消失。因此认为 BMSCs 分泌的神经营养因子激活上述存活通路、抵抗凋亡应激反应,是发挥神经保护作用的最重要通路。

四、问题与展望

BMSCs 易于获取和分离培养,可快速扩增,具有多向

分化潜能,为骨科疾病的治疗提供了广阔的应用前景。但目前取得的研究成果大多限于动物模型,在临床上的应用仍处于起步阶段。仍有一些问题需要解决,如 BMSCs 的鉴定尚无一个明确有效的标准,其作用机制仍不十分明确,移植的时间、途径、剂量还有待于进一步研究。

我们相信随着研究的不断深入,相关问题一定会得到解决,从而在 BMSCs 移植治疗骨科疾病方面取得重大突破,为广大患者减轻病痛、提高生活质量提供巨大帮助。

参 考 文 献

- [1] Friedenstien AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kine*, 1970, 3(4):393-403.
- [2] Charbord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(9):1045-1056.
- [3] Nardi NB, Camassola M. Isolation and culture of rodent bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells. *Methods Mol Biol*, 2011, 698: 151-160.
- [4] Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth Kinetics, self-renewal, and the osteogenics potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*, 1997, 64(2):278-294.
- [5] Agata H, Watanabe N, Ishii Y, et al. Feasibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone marrow stromal cells cultivated in serum-free conditions. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382(2):353-358.
- [6] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315-317.
- [7] Kwon BK, Fisher CG, Dvorak MF, et al. Strategies to promote neural repair and regeneration after spinal cord injury. *Spine*, 2005, 30(17 Suppl):S3-S13.
- [8] Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, et al. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest*, 2012, 122(1):80-90.
- [9] Zurita M, Vaquero J, Bonilla C, et al. Functional recovery of chronic paraplegic pigs after autologous transplantation of bone marrow stromal cells. *Transplantation*, 2008, 86(6):845-853.
- [10] Burns AS, O'Connell C. The challenge of spinal cord injury care in the developing world. *J Spinal Cord Med*, 2012, 35(1):3-8.
- [11] Park HC, Shim YS, Ha Y, et al. Treatment of complete spinal cord injury patients by autologous bone marrow cell transplantation and administration of granulocytemacrophage colony stimulating factor. *Tissue Eng*, 2005, 11(5-6):913-922.
- [12] 李志营,步星耀,张圣旭,等. 自体骨髓间充质干细胞联合周围神经移植治疗脊髓损伤. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(16):3041-3046.
- [13] Mont MA, Jones LC, Hungerford DS. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: ten years later. *J Bone Joint Surg Am*, 2006, 88(7):1602.
- [14] 刘长安,王江泳,张卫平,等. 骨髓基质干细胞移植治疗兔股骨头缺血性坏死的实验研究. *中国矫形外科杂志*, 2007, 15(1):58-60.
- [15] 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.
- [16] 杨晓凤,王红梅,许忆峰,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.
- [17] Labianca R, La Verde N, Garassino MC. Development and clinical indications of cetuximab. *Int J Biol Markers*, 2007, 22(1 Suppl 4):S40-S46.
- [18] Stewart WF, Ricci JA, Chee E, et al. Lost productive time and cost due to common pain conditions in the US workforce. *JAMA*, 2003, 290(18):2443-2454.
- [19] Zhao CQ, Jiang LS, Dai LY. Programmed cell death in intervertebral disc degeneration. *Apoptosis*, 2006, 11(12):2079-2088.
- [20] Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Accelerated cellular senescence in degenerate intervertebral discs: a possible role in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(3):R45.
- [21] Richardson SM, Hughes N, Hunt JA, et al. Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophate hydrogels. *Biomaterials*, 2008, 29(1):85-93.
- [22] Sobajima S, Vadala G, Shimer A, et al. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine J*, 2008, 8(6):888-896.
- [23] Orozco L, Soler R, Morera C, et al. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow

- cells; a pilot study. Transplantation, 2011, 92(7): 822-828.
- [24] Livingston T, Kadiyali S, Elkalay M, et al. Repair of canine segmental bone defects using all ogenic mesenchymal stem cells. Transactions of the 47th Annual ORS meeting, 2001:26.
- [25] 刘阳,朱立新,杨宏,等. 可注射性纳米羟基磷灰石/壳聚糖复合骨髓间充质干细胞促进骨缺损的修复. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(34):6278-6282.
- [26] Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, et al. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. Cell Transplant, 1997, 6(2):125-134.
- [27] Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, et al. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. J Clin Invest, 2012, 122(1):80-90.
- [28] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature, 2002, 418(6893):41-49.
- [29] Pijnappels DA, Schali J, Ramkisoensing AA, et al. Forced alignment of mesenchymal stem cells undergoing cardiomyogenic differentiation affects functional integration with cardiomyocyte cultures. Circ Res, 2008, 103(2):167-176.
- [30] Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. Transplantation, 2005, 80(6):836-842.
- [31] 张化彪,丁新牛,许干明,等. 大鼠脑出血模型应用骨髓间充质干细胞电治疗的实验研究. 中国临床神经科学, 2004, 12(2):140-142.
- [32] Zhou J, Tian GP, Wang JE, et al. *In vitro* differentiation of adipose-derived stem cells and bone marrow-derived stromal stem cells into neuronal-like cells. Neural Regen Res, 2011, 6(19):1467-1472.

收稿日期:2013-12-05

(上接第 118 页)

血坏死^[5]。此外,如果在恢复过程中力量粗暴,也能造成血流障碍。重要的是,学龄期及青春期股骨颈无骨膜,骨折后不能生成骨痂,骨折愈合主要依赖骨的爬行替代进行修复,若骨折复位不牢靠,过早、过多地负重以及不适当的功能锻炼均容易造成股骨颈愈合不良^[6]。本组 21 例病例中,我们在无手术禁忌证情况下选择急诊手术,手术视野有创面则先行皮牵引或骨牵引治疗 1 周后创面愈合后方手术。术中在 C 型臂 X 线机指引下复位,保证了复位成功。内固定材料,我们选用 2~3 枚钛质空心钉,对不同年龄段的患儿选用不同直径的螺钉 3 枚钉呈倒三角形固定,确保内固定坚强稳定。术后仍采用一定的制动措施,或皮牵引或髓人字石膏固定 6~8 周。术后严格随访,定期复查 X 线片,依 X 线片情况决定下地负重活动时间,一般在 6 个月后,呈渐加性负重功能锻炼。本组中均骨折愈合,无畸形发生。仅 1 例 II 型粉碎性骨折的患儿在术后 2 年 X 线片显示 I 期坏死表现,分析原因系骨折周围血供严重破坏所致。

由于学龄期及青春期股骨颈结构的特殊性,其手术过程中的关注点亦存在其特殊^[7]。手术过程中应当注意选择长度、粗细合适的空心钉,且所有螺纹必须过骨折线,头端不能接触骺板,既保证了抗力作用,又不损伤骺板^[8]。既达到了坚强的固定效果,又不致骨骺早闭。

总之,在严格把握手术适应证、合理的手术操作基础上,空心钉治疗学龄期及青春期股骨颈骨折创伤小、骨折治愈率高、并发症发生率低,疗效可靠。

参 考 文 献

- [1] Hughes LO, Beaty JH. Fractures of the head and neck of the femur in children. J Bone Joint Surg Am, 1994, 76(2):283-292.
- [2] Cheng JC, Tang N. Decompression and stable internal fixation of femoral neck fractures in children can affect the outcome. J Pediatr Orthop, 1999, 19(3):338-343.
- [3] Bali K, Sudesh P, Patel S, et al. Pediatric femoral neck fractures: our 10 years of experience. Clin Orthop Surg, 2011, 3(4):302-308.
- [4] Inan U, Kose N, Omeroglu H. Pediatric femur neck fractures; a retrospective analysis of 39 hips. J Child Orthop, 2009, 3(4):259-264.
- [5] Shrader MW, Jacofsky DJ, Stans AA, et al. Femoral neck fractures in pediatric patients: 30 years experience at a level 1 trauma center. Clin Orthop Relat Res, 2007, 454:169-173.
- [6] Shah AK, Eissler J, Radomisli T. Algorithms for the treatment of femoral neck fractures. Clin Orthop Relat Res, 2002, 399:28-34.
- [7] 蔡少华,杨建平,杨红军,等. 大龄儿童股骨颈骨折的治疗. 中华小儿外科杂志, 2006, 8(27):417-419.
- [8] 马瑞雪,李祁伟,张立军,等. 空心钉固定治疗小儿股骨颈骨折的临床观察. 中华小儿外科杂志, 2005, 26(11):567-568.

收稿日期:2013-06-19