骨髓干细胞治疗骨不连研究进展

殷俊辉 高悠水 张长青

摘要 近年随着对骨折愈合机制和骨髓间充质干细胞(BMSC)功能的研究深入,应用自体骨髓与BMSC治疗骨不连取得了可靠的理论与临床应用疗效。研究证实,局部富集的BMSC可被精确诱导分化为成骨前体细胞,一定浓度的BMSC在一定条件下具有可靠的成骨效果。该文就BMSC与骨折愈合、骨不连治疗的体外动物实验研究和临床应用研究进展作一简要综述。

关键词 骨不连;骨髓移植;骨髓间充质干细胞
DOI:10.3969/j.issn.1673-7083.2011.02.014

骨不连是骨折常见并发症,不仅延长治疗周期、增加治疗成本,而且严重影响患者生活质量和患肢功能[1]。传统治疗方法如各种植骨术、重新内固定术等,虽可使多数骨不连获得连接,但后期手术创伤、手术复杂性及可能出现的并发症使之成为骨科难症[2]。近年随着对骨折愈合机制和骨髓间充质干细胞(BMSC)功能的深入研究,应用BMSC治疗骨不连取得了可靠的理论依据和临床试验结果[3]。

1 BMSC与骨折愈合

骨折愈合主要包括炎性期、软骨痂形成期、硬骨痂形成期及重塑形期,骨不连可看作是骨折愈合过程中断而导致的结果[4]。BMSC是中胚层组织共同的前体细胞,在特定诱导条件下可分化为成骨细胞、成软骨细胞、成脂细胞等,这些细胞是骨折愈合过程中不可或缺的重要部分。一般认为,骨折愈合过程主要取决于成骨细胞及破骨细胞的协调作用,成骨细胞主要完成骨折愈合,破骨细胞则实现骨塑形和重构[5]。骨折造成周围损伤组织细胞释放一系列细胞因子,如转化生长因子(TGF)-β1、白细胞介素(IL)-1、血管内皮生长因子(VEGF)等,这些细胞因子对髓腔及循环中的BMSC具有特定募集作用[6,7]。虽然局部富集的BMSC如何被精确诱导分化为成骨前体细胞目前仍不清楚,但可以明确的是,局部微环境是最主要的影响因素[8]。除了上述细胞因子外,微环境循环状态、缺氧等物理因素可能也是诱导BMSC分化的重要因素[9-11]。

软骨痂形成期发生于骨折后2~3周,位于骨外膜和骨内膜生发层的BMSC受到刺激向成骨细胞分化。距骨折间隙一定距离的骨表面开始发生膜内附着性成骨,在骨外膜形成一套袖状编织骨并填充髓腔。靠近骨折端时,BMSC增生扩散,穿过骨痂并分化为骨祖细胞,其可通过高度调控机制分裂成2个干细胞或2个定向祖细胞。干细胞在整个过程中处于相对静止状态,由定向祖细胞完成DNA合成和细胞扩充任务,在保留其原有遗传信息的条件下,在不断产生祖细胞的同时自身则不增殖也不分化[12]。但在含有地塞米松、抗坏血酸、甘油磷酸盐的培养液诱导下,定向祖细胞向成骨细胞分化,成为成纤维细胞或软骨细胞,而纤维组织和软骨组织各自发挥细胞外基质的作用,逐渐取代血肿。BMSC在分化过程中会先后出现特征性骨细胞特征,即合成Ⅰ型胶原、表达碱性磷酸酶、分泌骨钙素及出现羟基磷灰石沉积。

作者单位:200233, 上海交通大学附属第六人民医院骨科

在向骨细胞系统分化,参与骨折愈合、重构的同时,BMSC与其他前体细胞如内皮祖细胞、结缔组织干细胞之间存在信息沟通[13,14]。虽然目前对成骨与成血管之间的关联研究逐渐深入,但对其机制仍所知甚少。Matsumoto等[15]研究发现,骨折愈合中成骨功能与干细胞因子及其受体(SCF-cKit)信号通路中Lnk依赖轴有关,不表达Lnk的实验动物骨折后愈合明显增快。

2 体外动物实验研究

Goujon于1869年经动物实验证实骨髓在兔骨不连模型中具有成骨作用,目前已有自体BMSC用作骨移植替代物的动物实验和临床试验研究报道。虽然BMSC的效果值得肯定,但BMSC低温保存及对其生物学行为影响方面的研究仍有待探索。体外研究证实,离体BMSC增殖后失去了成骨能力,因此保持其活性非常重要。Galmes等[16]研究发现,骨髓细胞在-196℃~25℃环境中的活性变化较大,冰点控制对于冰冻骨髓中BMSC菌落形成单位活性恢复很重要,同时浓缩的二甲亚砜对于BMSC低温保存也具有促进作用,但即使是控制好冰点并加入二甲亚砜的骨髓培养,冰融时还是会杀死50%以上有核细胞及20%集落生成细胞。Cancedda等[17]报道显示,自体骨髓移植可用于治疗较大范围的骨不连、骨缺损。

Ma等[18]采用一大鼠胫骨骨不连模型研究冰冻骨髓对骨折愈合的作用,即动物自体骨髓细胞经冰冻培养后,分别取培养1、2、3周的细胞注入大鼠骨不连模型骨缺损处,8周后全部大鼠经静脉注射过量戊巴比妥处死,经放射学分析、骨密度测量及组织工程学分析证实,自体骨髓移植可成功促进骨折愈合和骨修复,骨髓基质细胞和骨祖细胞在此过程中发挥了重要作用;骨髓骨祖细胞在10%二甲亚砜及90%自体血清中生存更久,冷藏保存处理方法可促进骨髓生成新骨。

3 临床应用研究

在动物实验证实骨髓与BMSC移植促进骨折愈合的基础上,很多学者开展相关临床试验研究,并取得优良结果。Hernigou等[19]报道选取60例非感染性胫骨骨不连患者,在骨不连处均植入20 ml浓缩骨髓,经成纤维细胞菌落计数评估骨祖细胞数及计算机断层扫描对比骨髓植入前和植入后4个月矿化骨形成体积证实,植入骨不连骨缺损处的骨髓骨祖细胞达到一定浓度时,骨不连疗效很好。童培建等[20]报道经皮注射BMSC治疗48例四肢骨干骨不连患者(每月注射治疗1次,6个月后仍未见骨折愈合则停止治

万方数据

疗),随访3～8个月(平均12.8个月)后42例达到骨性愈合(平均愈合时间为4.7个月),X线显示骨折线消失及骨痂形成。朱六龙等[21]采用BMSC复合纤维蛋白胶方法治疗19例骨不连患者,术后随访5～24个月(平均10.7个月),结果显示注射6个月后有14例患者达到骨性愈合,未见感染和供区并发症。Goel等[22]选取20例胫骨骨不连患者并经皮注入自体骨髓于骨不连处,4～6周重复1次,临床及X线片显示有15例达到术后恢复,自首次注射治疗开始的平均愈合时间为14周,充分证实自体骨髓移植治疗胫骨骨不连伴轻微骨缺损的操作简单,疗效可靠。Bajada等[23]报道将硫酸钙($CaSO_4$)混合BMSC注入骨不连处,治愈1例经6次手术治疗后仍未出现愈合迹象长达9年的胫骨骨不连患者,随访2个月发现骨折线消失。Tetreault等[24]则报道应用骨髓注射技术成功治愈锁骨骨折术后骨不连患者。

从组织工程学理论出发,经皮注射自体骨髓或BMSC可为骨不连处提供新鲜的种子细胞,那么能否将细胞因子,甚至生物相容性良好的支架材料一并植入骨不连处,实现更快的骨折愈合呢?近年报道[6,7,25]显示,自体骨髓复合各种细胞因子如骨形态发生蛋白(BMP)-2、BMP-7、VEGF、TGF-β1,复合β-三磷酸钙、高聚糖等的移植效果良好。Ling等[26]选取17例皮肤及软组织条件均较好的骨干骨不连患者(10例胫骨骨不连,5例桡骨骨不连,2例锁骨骨不连;11例增生性骨不连,6例萎缩性骨不连),术中拆除最初固定装置后用髓内固定或接骨板重新固定骨折,在骨不连处注入骨髓后以深筋膜封闭骨不连断端,随访显示骨不连愈合时间为12～20周(平均16周),且证明复合深筋膜的自体骨髓移植缩短了骨不连愈合时间。Koob等[27]报道BMSC复合上皮细胞治疗实验性巨大骨缺损,也取得了喜人的疗效。

4　结语

自体骨髓与BMSC移植治疗骨不连有诸多优点,手术创伤较小,可避免很多并发症。用于某些骨缺损较少或骨折延迟愈合病例以替代骨移植,可达到很好疗效。骨髓可反复抽取,来源较丰富,技术操作较简单、安全,易推广,且无免疫排斥反应等。但自体骨髓移植应用的前提是有稳定的内固定或外固定,不适宜于缺损>5 mm的骨不连、骨缺损[28];此外,需保持移植骨髓液中骨祖细胞的浓度。在骨髓注射治疗过程中,应注意指导患者适当功能锻炼,以防止异位骨化。

有研究[29]证实骨不连部位仍存有BMSC,但骨髓或BMSC注射可增加局部BMSC浓度。BMSC体外分离、培养、诱导定向分化技术的简便、安全使得经皮注射BMSC治疗骨不连具有更加广阔的应用前景,脂肪干细胞的开发有助于克服BMSC来源的局限性[30]。未来仍需要研究更加理想的生物或物理复合方法,不断优化材料的复合设计,使骨髓移植治疗骨不连的愈合时间进一步缩短,疗效更显著,适应证范围更广泛。

参考文献

1 Frolke JP, Patka P. Definition and classification of fracture non-unions. Injury, 2007; 38(Suppl 2):S19-S22
2 Olson S, Hahn D. Surgical treatment of non-unions: a case for internal fixation. Injury, 2006; 37(8):681-690
3 Tseng SS, Lee MA, Reddi AH. Nonunions and the potential of stem cells in fracture-healing. J Bone Joint Surg Am, 2008; 90(Suppl 1):92-98
4 Calori GM, Albisetti W, Agus A, et al. Risk factors contributing to fracture non-unions. Injury, 2007; 38(Suppl 2):S11-S18
5 Deschaseaux F, Sensebe L, Heymann D. Mechanisms of bone repair and regeneration. Trends Mol Med, 2009; 15(9):417-429
6 Zhao L, Jiang S, Hantash BM. Transforming growth factor beta1 induces osteogenic differentiation of murine bone marrow stromal cells. Tissue Eng Part A, 2010; 16(2):725-733
7 Kerameris NC, Calori GM, Nikolaou VS, et al. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. Injury, 2008; 39(Suppl 2):S45-S57
8 Khosla S, Westendorf JJ, Modder UI. Concise review: Insights from normal bone remodeling and stem cell-based therapies for bone repair. Stem Cells, 2010; 28(12):2124-2128
9 Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, et al. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. BMC Cell Biol, 2010; 11:11
10 Araldi E, Schipani E. Hypoxia, HIFs and bone development. Bone, 2010; 47(2):190-196
11 Potier E, Ferreira E, Andriamanalijaona R, et al. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. Bone, 2007; 40(4):1078-1087
12 Bianco P, Gehron-Robey P. Marrow stromal stem cells. J Clin Invest, 2000; 105(12):1663-1668
13 Matsumoto T, Kuroda R, Mifune Y, et al. Circulating endothelial/skeletal progenitor cells for bone regeneration and healing. Bone, 2008; 43(3):434-439
14 D'Amelio P, Cristofaro MA, Grimaldi A, et al. The role of circulating bone cell precursors in fracture healing. Calcif Tissue Int, 2010; 86(6):463-469
15 Matsumoto T, Ii M, Nishimura H, et al. Lnk-dependent axis of SCF-cKit signal for osteogenesis in bone fracture healing. J Exp Med, 2010; 207(10):2207-2223
16 Galmes A, Besalduch J, Bargay J, et al. A simplified method for cryopreservation of hematopoietic stem cells with -80 degrees C mechanical freezer with dimethyl sulfoxide as the sole cryoprotectant. Leuk Lymphoma, 1995; 17(1-2):181-184
17 Cancedda R, Bianchi G, Derubeis A, et al. Cell therapy for bone disease: a review of current status. Stem Cells, 2003; 21(5):610-619
18 Ma HL, Chen TH, Hung SC. Development of a new method in promoting fracture healing: multiple cryopreserved bone marrow injections using a rabbit model. Arch Orthop Trauma Surg, 2004; 124(7):448-454
19 Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, et al. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. J Bone Joint Surg Am, 2005; 87(7):1430-1437
20 章培建,厉驹,翟杭波,等. 经皮自体骨髓间充质干细胞移植治疗四肢骨折骨不连. 中华创伤杂志, 2007; 23(7):499-501
21 朱六龙,季成,邹成,等. 自体骨髓间充质干细胞注射治疗骨不连19例. 中华创伤杂志, 2008; 24(3):173-175
22 Goel A, Sangwan SS, Siwach RC, et al. Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union. Injury, 2005; 36(1):203-206
23 Bajada S, Harrison PE, Ashton BA, et al. Successful treatment of refractory tibial nonunion using calcium sulphate and bone marrow stromal cell implantation. J Bone Joint Surg Br, 2007; 89(10):1382-1386
24 Tetreault P, Ouellette HA. Healing of a clavicle fracture nonunion with bone marrow injection. J Shoulder Elbow Surg, 2007; 16(1):e23-e24
25 Dinopoulos H, Giannoudis PV. The use of bone morphogenetic proteins (BMPs) in long-bone non-unions. Curr Orthop, 2007; 21(4):268-279
26 Ling HM, Wu HX, Huang CY, et al. Deep fascia composite autologous red bone marrow transplantation for the treatment of fracture nonunion. Zhongguo Gu Shang, 2009; 22(11):859-861
27 Koob S, Torio-Padron N, Stark B, et al. Bone formation and neovascularization mediated by mesenchymal stem cells and endothelial cells in critical-sized calvarial defects. Tissue Eng Part A, 2011; 17(3-4):311-321
28 Ma JT, Yu M, Zhang MC, et al. Clinical observation on percutaneous autologous bone marrow grafting for treatment of fracture nonunion. Zhongguo Gu Shang, 2009; 22(11):862-864
29 Iwakura T, Miwa M, Sakai Y, et al. Human hypertrophic nonunion tissue contains mesenchymal progenitor cells with multilineage capacity in vitro. J Orthop Res, 2009; 27(2):208-215
30 Shoji T, Ii M, Mifune Y, et al. Local transplantation of human multipotent adipose-derived stem cells accelerates fracture healing via enhanced osteogenesis and angiogenesis. Lab Invest, 2010; 90(4):637-649

(收稿:2010-11-21;修回:2010-12-27)
(本文编辑:翁洁敏)

万方数据