文章编号:1000-5404(2008)09-0851-04

论著

自体间充质干细胞构建组织工程骨修复人长骨缺损的临床观察

刘 杰,吴雪晖,罗 飞,何清义,代 飞,谢 肇,许建中 (第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心,重庆 400038)

摘 要:目的 观察个体化组织工程骨用以修复患者长骨缺损的疗效与安全性。方法 利用组织工程技术,通过抽取临床上骨源缺乏的患者少量骨髓分离出其中的人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cell,hMSCs),并在体外对其进行扩增培养并诱导分化后,与自制的同种异体脱钙骨基质相复合,构建个体化的组织工程骨并应用于临床,通过临床随访其放射学及血液学结果评价其疗效与安全性。结果 30 例个体化组织工程骨临床应用患者均达到随访半年以上,随访资料显示成骨速度及效果均与自体骨类似,且术后肝肾功、血沉等指标均无明显异常,最长随访达 4 年未发现病灶复发。结论 由患者自体间充质干细胞构建的组织工程骨具有良好的生物安全性和成骨效能。

关键词:间充质干细胞;组织工程骨;修复;长骨缺损
中图法分类号:R318.08;R329.2;R681.05 文献标识码:A

Autogenous mesenchymal stem cells repair long bone defects: clinical report of 30 cases

LIU Jie, WU Xue-hui, LUO Fei, HE Qing-yi, DAI Fei, XIE Zhao, XU Jian-zhong (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect and safety of the tissue-engineered bone which is constructed from the autogenous mesenchymal stem cells (MSCs) from bone marrow. Methods Totally 30 patients who suffered from long bone defect because of tumor or trauma were subjected in this study with informed consent. MSCs, isolated from every individual patient's bone marrow, were cultured *in vitro* and induced to differentiate into osteoblasts, and finally mount to a self-made allogeneic decalcified bone matrix scaffold in order to construct tissue-engineered bone (TEB). Then the engineered bone was transplanted into the defect. In this procedure, strict screening and detections were carried out on the target cells or tissues in different phases of the TEB construction. The efficacy and security of this approach were evaluated by radiological and serological assays and the outcomes of follow-up. Results All patients were followed up for over half a year and the longest was 4 years. The therapeutic effects of the TEB was similar to autologous bone treatment in bone formation rate and outcome. There was no any abnormality in hepatic/renal functions, ESR, immunoglobins during the follow-up. Conclusion The individualized tissue-engineered bone made of the patient's autologous mesenchymal stem cells shows favourable biological safety and satisfactory osteogenic capability.

Key words: mesenchymal stem cells; tissue-engineered bone; repair; long bone defects

创伤、肿瘤、先天性畸形、感染等原因造成的骨缺损是导致伤残的重要因素之一。自体松质骨移植是目前临床治疗骨缺损的首选[1],但因其来源有限,所导致的并发症多,如供区疼痛、感觉异常、出血、不愈合、感染可达 8% ~10%[2]。对于长骨干骨缺损虽然可以利用骨转移术[3]或骨延长术[4]达到治疗的目的,但由于治疗时间长,多种并发症时有发生,严重影响患者的生活质量,故已很少被临床采用。骨组织工程的出现为临床修复因创伤或骨病导致的骨缺损提供了一种全新的治疗方法[5],特别对于自体骨源缺乏的患者尤其适用。对人间充质干细胞的最初研究始于 Friedenstein1966 年对骨髓细胞的成骨作用研究[6],其在骨髓有核细胞中的含量很少,仅占 0.001% ~0.01%[7],然

基金项目:国家自然科学基金(2003AA205002)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(2003AA205002)
作者简介:刘 杰,男,山东省青岛市人,博士研究生,主治医师,主要从事骨科临床、组织工程方面的研究。电话:(023)68753341,E-mail:liujietmmu@hotmail.com
通信作者:许建中,电话:(023)68754164,E-mail:spine@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2008-01-07 修回日期:2008-03-12

而人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells,hMSCs)能在体外大量扩增的特性使其成为骨组织工程种子细胞的充足来源,研究还提示临床应用时种子细胞的获取途径可以是多元化的(即除骨髓以外的骨外膜、松质骨、脂肪组织、滑膜组织、骨骼肌和乳牙)[8],但其提取分离步骤繁琐,不利于临床推广应用。作为骨组织工程理想的支架材料不仅应具有良好的生物相容性,其降解性能也必须适合骨的生长,与生成、骨改建同步,既不能降解过快而失去支架作用,也不应绝对稳定,没有吸收而影响骨的改建。脱钙骨基质(DBM)作为组织工程骨支架材料,虽然其孔径范围完全覆盖了 Hulbert 等[9]报道的适宜骨修复的最佳孔径即 100 ~ 250 μm,然而 Acarturk 等[10]的研究结果表明并非所有已获准上市的 DBM 支架在修复颅面部骨缺损时都表现出相同的骨诱导特性。虽然同种异体的 DBM 以其良好的生物相容性已经走上医疗市场,但其疗效差异性大,缺乏比较统一的制作工艺流程和按照此流程进行的一系列临床观察。本研究则在一定程度上对其做出了补充,在以往大动物实验获得圆满成功的基础上[11],将自骨髓中分离间充质干细胞这一经典技术在满足适应证患者中试用,旨在初步了解人体在接受组织工程骨后的全身及局部反应、成骨疗效并验证其安全性,为临床上骨源缺乏的患者提供一条新的治疗途径,以期为今后组织工程骨修复长骨缺损技术的产业化、规模化完成部分早期的探索性工作。

1 资料与方法

1.1 对象

在解放军总后勤部卫生部的批准和患者'自愿参与、知情同意'的前提下,我们遵循自愿公平、双向选择的原则,于 2003 -2007 年在本科四肢骨肿瘤病区纳入 30 例受试者,男性 18 例,女性 12 例。入选本试验的病种主要为四肢长骨的良性骨肿瘤及瘤样病变、创伤等原因造成或曾行多次手术均提示疗效较差的腔隙性骨缺损患者。受试者经心电图,肝、肾功能检查无严重病变,并自愿加入组织工程骨临床试用的受试者方可正式纳入。排除标准:各种恶性骨肿瘤、骨纤维瘤病、急性骨关节感染、活动性骨结核,以及各种传染病导致的骨关节损害。所有临床资料均来自于本科组织工程骨临床试用者住院期间的病程记录、化验单及院外随访期间的化验检查报告单及通过电话随访联系得到的数据。

1.2 方法

1.2.1 术前准备 确认患者纳入并与志愿者签署临床试用协议书后,收集患者基本信息,抽取患者髂骨骨髓,根据其身体耐受能力抽取全血并分离自体血清备用,或使用胎牛血清处理支架和行上架后培养。根据组织工程骨制备情况,安排患者在手术植入前 2 d 入院;入院后严格按照组织工程骨临床路径组织患者完善各项指标。

1.2.2 手术方法 常规麻醉、消毒、铺巾后,显露病灶区,彻底刮除病灶,再以 20 ml 注射器向囊腔内注射生理盐水以测量腔内体积后,予大量温度约 37 ℃生理盐水反复冲洗,最后植入从实验室密封运送的组织工程骨,根据需要对患肢实行内固定或外固定。

1.2.3 放射学及血液学检查 根据本院放射科所拍摄的 X 线片及 16 排 CT 检查的结果对参加组织工程骨临床试用的患者定期进行检查并评价其成骨效果。随访患者术后不同时间点的血液碱性磷酸酶测定以及骨钙素测定结果作为体内成骨活动评价指标。随访患者术后不同时间点的血常规、肝肾功、血沉、免疫球蛋白测定、C 反应蛋白、输血前 ICT、乙肝病毒 PCR 以及补体测定结果作为组织工程骨植入体内后安全性评价指标。

1.3 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 12.0 统计软件处理。同一患者术前术后不同时间点血清学检查结果采用自身对照方法设计,统计分析采用配对 t 检验。

2 结果

2.1 血清学检查结果

结果显示组织工程骨植入术后对患者的基本生命体征的影响主要是体温的升高,与术前比较差异显著($P<0.05$),但术后第 5 天起逐渐恢复正常($P>0.05$,表 1);血沉和中性粒细胞百分比仅在术后 1 周有所升高,与术前比较差异显著($P<0.05$),且均在术后 3 个月时恢复正常($P>0.05$,表 2);组织工程骨的植入对肝功能各项指标无显著统计学意义的影响,导致肌酐和尿酸与术前相比发生的轻度升高现象也在术后 2 个月即已消失($P>0.05$,表 3);代表机体成骨活动的骨钙素水平测定结果则显示在术后 2 个月内均保持显著升高状态($P<0.05$),术后 3 个月时逐渐恢复正常水平($P>0.05$,图 1);代表对植入骨免疫反应的补体蛋白 C3 和 C4 检测结果亦分别在术后 2 个月和术后 3 个月恢复正常($P>0.05$,图 2)。输血前 ICT、乙肝病毒 PCR 结果显示组织工程骨不存在传播常见疾病可能。

2.2 放射学检查结果

资料显示,个体化组织工程骨对修复腔隙性骨缺损植骨疗效良好,复发率低。临床典型病例为一女性患者,8 岁,诊断为左胫骨近段动脉瘤样骨囊肿,曾经历自体骨和异体骨移植两次手术治疗,均在 1 年内复发宣告治疗失败,来我院后实行组织工程骨修复胫骨上段缺损后随访 4 年未见复发(图 3)。

表 1 受试者住院期间生命体征测定结果($n=30$,$\bar{x} \pm s$)

时间	体温(℃)	脉搏(次/min)	呼吸(次/min)	收缩压/舒张压(mmHg)
术前	36.6 ±0.4	88.3 ±7.3	19.6 ±1.2	112.0 ±14.6/65.7 ±11.0
术后1 d	36.8 ±0.4[a]	90.6 ±7.0	20.2 ±1.2	110.3 ±13.4/68.2 ±11.7
术后2 d	37.0 ±0.4[a]	92.2 ±5.6	21.2 ±0.9	108.8 ±12.5/68.2 ±9.4
术后3 d	37.0 ±0.4[a]	90.9 ±6.1	20.7 ±1.0	106.2 ±11.9/68.0 ±11.9
术后4 d	36.9 ±0.4[a]	90.6 ±9.1	20.3 ±0.6	106.2 ±10.1/67.7 ±7.9
术后5 d	36.8 ±1.1	88.2 ±6.4	20.2 ±0.8	106.2 ± 9.9/69.5 ±8.5
术后7 d	36.7 ±0.4	88.0 ±5.6	20.4 ±0.7	105.9 ±12.3/68.9 ±9.0

a:$P<0.01$,与术前比较

表 2　受试者术前及术后血沉及血常规测定结果

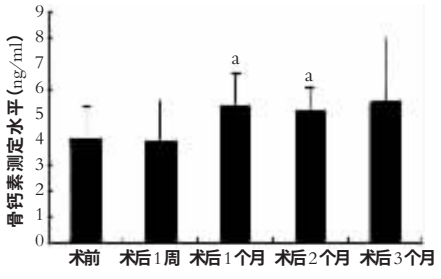
时间	血沉 (mm/h)	白细胞计数 ($\times 10^9$)	中性粒细胞比例(%)	淋巴细胞比例(%)
术前	5.2 ±5.8	6.2 ±1.7	53.8 ±15.8	34.5 ±12.3
术后 1 周	12.0 ±7.6[a]	7.5 ±1.9[a]	62.6 ±10.6[a]	25.0 ±7.1
术后 1 个月	10.5 ±7.1[a]	6.5 ±1.4	61.6 ±10.5	32.3 ±10.2
术后 2 个月	9.6 ±7.0[b]	6.0 ±1.6	62.4 ±8.0[b]	32.1 ±8.7
术后 3 个月	8.9 ±5.0	5.7 ±1.7	50.5 ±20.8	30.0 ±10.6

a:$P<0.01$, b:$P<0.05$,与术前比较

表 3　受试者术前及术后肝肾功检测结果

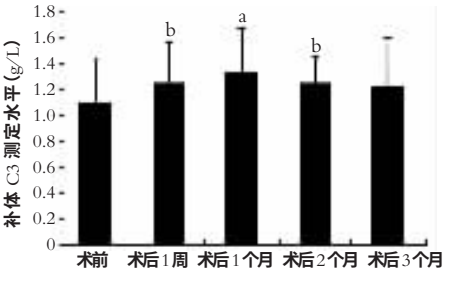
时间	碱磷酶 (IU/L)	谷草转氨酶 (IU/L)	谷丙转氨酶 ALT(IU/L)	肌酐 (μmol/L)	血尿酸 (μmol/L)
术前	67.6 ±15.1	24.1 ±5.5	32.0 ±14.3	48.8 ±15.1	299.6 ±68.8
术后 1 周	67.7 ±17.8	43.4 ±52.5	34.7 ±19.0	51.1 ±22.1	236.2 ±55.2[a]
术后 1 个月	82.8 ±43.2	28.2 ±6.9	34.4 ±12.2	64.7 ±22.2[a]	277.9 ±65.1
术后 2 个月	86.7 ±33.3	31.1 ±14.1	47.2 ±55.2	56.7 ±20.8	279.4 ±64.2
术后 3 个月	85.1 ±18.7	29.4 ±14.1	40.6 ±31.5	55.9 ±17.7	290.6 ±86.0

a:$P<0.05$,与术前比较



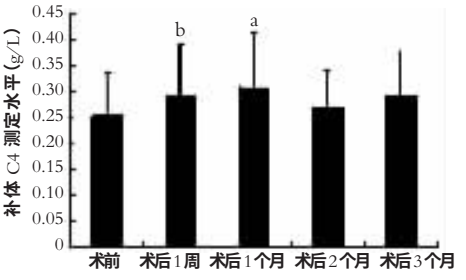
a:$P<0.01$,与术前比较

图 1　受试者骨钙素检测结果



a:$P<0.01$, b:$P<0.05$,与术前比较

图 2　受试者补体 C3 检测结果



a:$P<0.01$, b:$P<0.05$,与术前比较

图 3　受试者补体 C4 检测结果

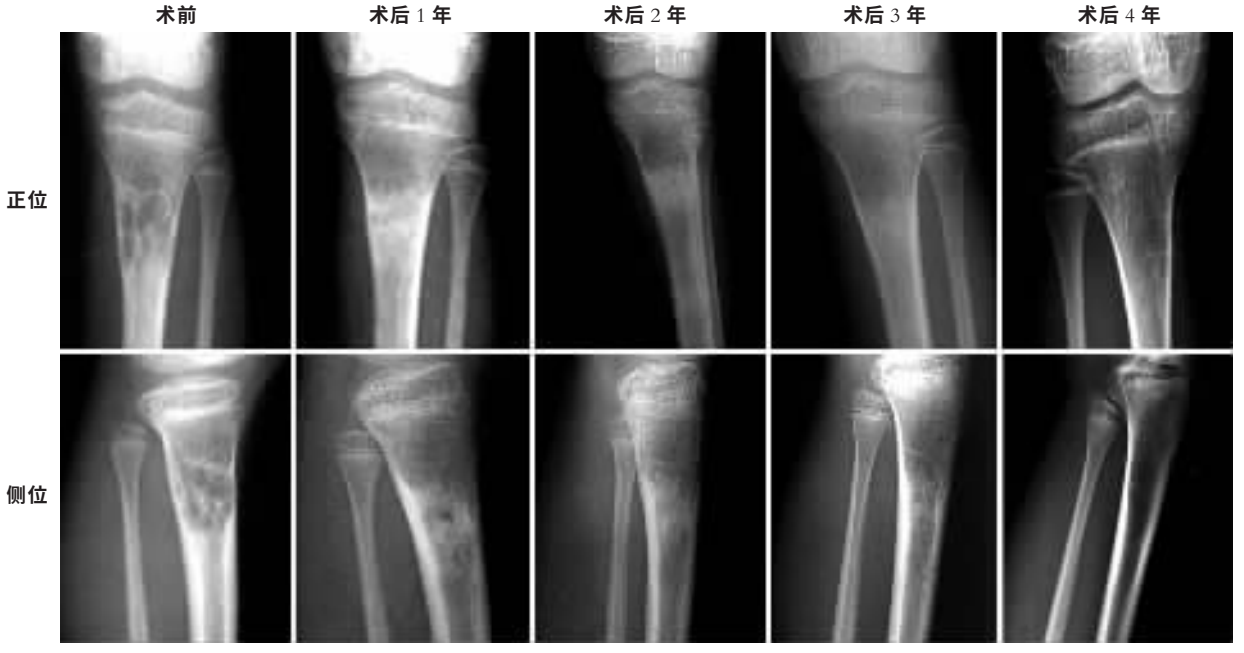


图 3　组织工程骨修复长骨缺损临床病例术前与术后 1 ~ 4 年 X 线片对比

3　讨论

骨组织工程是采用组织工程学原理与方法,研制具有修复骨缺损能力的骨替代物即‘人工骨’的一门科学。理想的‘人工骨’要求是:无细胞毒性;无或低免疫原性;生物降解速度与新骨形成速度匹配,最终将被新生骨组织替代;可在骨缺损区起到一定的支架作用;较易制备或获取。本研究将此类患者的 hMSCs 从其少量骨髓中分离,体外增殖到所需的数量级后再将其向成骨方向诱导,最后与经过预处理的脱钙骨基质(DBM)支架复合构建个体化的组织工程骨,植入骨缺损区,初步观察了患者对植入骨的全身反应及成骨效果,研究结果提示利用从人骨髓中分离出间充质干细胞并加以扩增诱导后可以满足临床构建组织工程骨的

需要。以此标准筛选目前的骨移植材料后，本实验选取人同种异体脱钙骨基质（DBM）作为组织构建的支架材料[12]。临床观察安全性方面，表1中可见除体温在术后前4 d与术前相比有统计学意义的升高外，其余观察项目如脉搏、呼吸、血压在术前术后均无显著意义加快或升高，且自术后5 d起体温波动范围与术前相比差异也没有统计学意义，表明组织工程骨的植入对患者基本生命体征的影响较小，且主要集中在体温方面，这一点与以往我们对单独植入DBM支架材料患者的观察结果有所类似且反应更轻，其原因除了手术应激的因素之外亦不能排除支架材料与植骨床之间发生免疫反应的可能，提示今后应对支架材料做进一步研究。表2中对患者血沉、血常规的持续监测结果也表明患者接受手术后2个月内虽然有所升高，但最终均基本恢复正常，提示组织工程骨的植入早期可能导致轻度的炎症反应，但最终不会对全身造成明显影响，这与Sokolova等[13]认为间充质干细胞与成骨细胞对于局部炎症反应具有明显抑制作用的实验结果基本一致。表3中则除了术后1个月的肌酐和术后1周的尿酸有所升高后又转为正常外，无一异常升高，考虑其原因可能是术后患者增加了营养食品摄入所致。临床观察有效性方面，最具代表体内成骨活动的骨钙素测定结果显示术后2个月内有显著的升高，术后3个月则与术前比较差异无统计学意义，提示组织工程骨的植入对机体成骨活动的刺激至少持续2个月以上且随着时间的延长此作用逐渐减弱。补体C3、C4在手术1个月后检查结果与术前相比差异均无统计学意义的升高，则进一步验证了组织工程骨所独具的生物相容性良好的特点[14]。

本实验在对种子细胞的培养、支架材料的制作和组织工程骨的构建以及临床随访项目标准化的基础上，将构建的个体化组织工程骨用以临床修复各类良性病变造成的长骨缺损，通过对组织工程骨临床试用者各时期的血清学持续监测、放射学动态观察和长期随访（半年以上，最长达术后4年）初步证实了组织工程骨用于修复各类长骨缺损不仅疗效满意，而且具有较强的生物安全性，提示其具有良好的组织相容性和较为广泛的临床应用前景，也为临床骨源缺乏患者的治疗提供了一条新的途径。当然目前的组织工程骨构建耗时较长（3周左右）且保存运输条件苛刻[15]，一定程度上限制了其广泛应用于临床，故对其长期保存运输的处理技术的深入探索将是未来应用基础研究的重心之一。

参考文献：

[1] Zarate-Kalfopulos B, Reyes-Sanchez A. Bone grafts in orthopedic surgery[J]. Cir Cir, 2006, 74(3): 217 - 222.

[2] Lohmann H, Grass G, Rangger C, *et al*. Economic impact of cancellous bone grafting in trauma surgery[J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2007, 127(5): 345 - 348.

[3] Friedrich J B, Moran S L, Bishop A T, *et al*. Free vascularized fibular graft salvage of complications of long-bone allograft after tumor reconstruction[J]. J Bone Joint Surg Am, 2008, 90(1): 93 - 100.

[4] Rozbruch S R, Pugsley J S, Fragomen A T, *et al*. Repair of tibial nonunions and bone defects with the Taylor Spatial Frame[J]. J Orthop Trauma, 2008, 22(2): 88 - 95.

[5] Meyer U, Wiesmann H P, Berr K, *et al*. Cell-based bone reconstruction therapies-principles of clinical approaches[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2006, 21(6): 899 - 906.

[6] Friedenstein A J, Piatetzky-Shapiro I I, Petrakova K V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells[J]. J Embryol Exp Morphol, 1966, 16(3): 381 - 390.

[7] Abdel-Aziz M T, Atta H M, Mahfouz S, *et al*. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis[J]. Clin Biochem, 2007, 40(12): 12, 893 - 899.

[8] Delorme B, Charbord P. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Methods Mol Med, 2007, 140: 67 - 81.

[9] Hulbert S F, Young F A, Matthews R S, *et al*. Potential ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses[J]. J Biomed Mater Res, 1970, 43(3): 443 - 456.

[10] Acarturk T O, Hollinger J O. Osteoregenerative capacity of commercially available demineralized bone matrix carrier formulations on critical size bone defects. Proceedings of the Plastic Surgery Research Council 49th Annual Meeting, June 9 - 12, 2004[C]. Michigan: Ann Arbor, 104.

[11] 秦 辉，许建中，王序全，等. 组织工程用大段负重骨缺损动物模型的建立[J]. 中国临床康复，2004，8(20)：3974 - 3975.

[12] Wan Y, Feng G, Shen F H, *et al*. Biphasic scaffold for annulus fibrosus tissue regeneration[J]. Biomaterials, 2008, 29(6): 643 - 652.

[13] Sokolova I B, Zin'kova N N, Shvedova E V, *et al*. Distribution of mesenchymal stem cells in the area of tissue inflammation after transplantation of the cell material *via* different routes[J]. Bull Exp Biol Med, 2007, 143(1): 143 - 146.

[14] Jagur-Grodzinski J. Polymers for tissue engineering, medical devices, and regenerative medicine. Concise general review of recent studies[J]. Polym Adv Technol, 2006, 17 (6): 395 - 418.

[15] Yu H B, Shen G F, Wei F C. Effect of cryopreservation on the immunogenicity of osteoblasts[J]. Transplant Proc, 2007, 39(10): 3030 - 3031.

（编辑 栾 嘉）