

幼龄骨髓间质细胞与骨形态形成蛋白 移植于老年大鼠骨中的实验研究

徐栋梁 李佛保

摘要 为了促进骨质疏松性骨折的愈合,作者将幼龄 SD 大鼠之骨髓间质细胞与牛骨形态形成蛋白(BMP)联合或单独植入绝经后骨质疏松性 SD 大鼠股骨和胫骨人工缺损孔洞内,通过动态观察术后第 3 天,第 1,2,4 周骨血生化,骨组织学和骨组织形态计量学变化,显示年轻的骨细胞在移植于绝经后骨质疏松骨内后,可在局部生存,生长,并经过软骨内成骨过程,形成网络状骨结构,第 4 周时新旧骨之间已紧密结合,骨质量好。合用 BMP 时效果更显著。而对照组形成较多的岛屿状的骨小梁,骨质量较差。各组钙、磷代谢平衡未受到明显干扰,而碱性磷酸酶活性在实验组显著增强。各组均未见明显移植排斥病理反应。

关键词 骨髓间质细胞 骨形态形成蛋白 骨质疏松 细胞移植

电镜观察显示老年人骨细胞和骨基质的退行性变与年龄呈正相关,骨母细胞的活性显著降低^[1]。老年人及绝经后妇女多有骨质疏松,易继发骨折,而且难以愈合。Nordin 等人证实骨衰老后骨形成的诱导十分困难^[2]。Sato 和 Prolo 等人先后报道 BMP 可诱导血管周围的间质细胞^[3]和骨髓间质细胞^[4]分化成骨。为了促进骨质疏松性骨折的愈合,作者将幼龄 SD 大鼠骨髓间质细胞与牛骨形态形成蛋白(BMP)联合或单独植入绝经后骨质疏松性 SD 大鼠股骨和胫骨人工缺损孔洞内,动态观察移植细胞的变化过程,报道如下。

1 材料与方法

选择 12 月龄因生育功能下降后而退休的健康 SD 大白鼠,共 60 只,雌性,体重 317~352 克。无菌、麻醉条件下切开皮肤,钝性分离肌肉。于各鼠股骨中段(皮质骨)和胫骨上段(松质骨)用骨科钻钻取直径 3mm 的骨缺损,其深度为一侧骨皮质与骨髓腔直径之和。以体重差小于 10 克为标准,将大鼠配伍分成 3 组,每组 20 只。第 1 组:骨髓间质细胞(BMSC)与 BMP 联

合移植组;第 2 组:单纯 BMSC 移植组;第 3 组:空白对照组。用生理盐水冲净骨屑后,缝合肌肉和皮肤,以充分覆盖骨缺损口。按分组用注射器分别注入上述成分,空白组则用等量生理盐水。骨髓间质细胞则通过抽取 1 月龄 SD 大鼠胫骨、股骨骨髓后用贴壁培养分离法获得^[5]。BMP 从新鲜牛骨中提取。先仔细分离出新鲜牛皮质骨,去除骨膜骨髓和软骨,液氮冷冻后粉碎机粉碎,然后依次脱脂脱钙,氯化锂提取,尿素盐析,离心沉淀冻干备用^[6]。第 1 组每孔中植入 1×10^5 个细胞和 0.5mgBMP;第 2 组只植入 1×10^5 个细胞。依次在植入手术后第 3 天、1、2、4 周取尾血测定血清钙、磷值及碱性磷酸酶(ALP)活性(Monarch 2000 型血生化仪)。同时,每组每次取 5 只鼠(共 20 个标本)进行骨组织形态计量学参数分析。后者参数有:1)骨小梁体积比:新生骨小梁占骨缺损体积百分比;2)平均骨小梁宽度:骨缺损内新生骨小梁的平均宽度;3)成骨细胞表面积比:新生骨小梁表面为成骨细胞覆盖的百分比^[7]。血生化及计量学参数按配对 *t* 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 血生化检查:术后第 3 天血钙值下降,血

磷值上升,但差别无统计学意义。术后第1~4周血钙血磷值变化不明显。术后ALP活性明显上升,第3天至第4周实验组高于对照组($P < 0.05$),术后第1周、第2周第1组高于第2组($P < 0.05$)详见下表1。

表1 移植前后各组骨血生化变化情况

项目	分组	移植前	移植后				
			3天	1周	2周	4周	
血清钙: (mmol/L)	1	2.55±	2.18±	2.47±	2.61±	2.65±	
		0.59	0.37	0.31	0.45	0.31	
		2.68±	2.24±	2.89±	2.65±	2.58±	
	2	0.41	0.25	0.27	0.32	0.47	
		2.65±	2.26±	2.51±	2.57±	2.58±	
		0.62	0.42	0.34	0.37	0.50	
	血清磷: (mmol/L)	1	1.27±	2.16±	1.14±	1.32±	1.37±
			0.34	0.71	0.62	0.32	0.37
			1.32±	2.11±	1.07±	1.04±	1.30±
2		0.29	0.50	0.51	0.58	0.51	
		1.25±	2.05±	1.22±	1.67±	1.21±	
		0.31	0.25	0.46	0.47	0.75	
ALP: (IU/L)		1	69±32	81±42*	117±	115±	115±
					57**	51**	67*
							101±
	2	55±37	78±45*	90±34*	95±67*	48*	
	3	55±41	67±35	70±42	89±52	88±56	

注: *第1或2组与3组相比, $P < 0.05$; **第1组与2或3组相比, $P < 0.05$

2.2 骨组织学检查: 各组动态观察中可见股骨中段(皮质骨)与胫骨上段(松质骨)之间,骨缺损处组织学变化基本相似。

2.2.1 术后第3天: 实验第1、2组内可见移植的细胞已开始增生繁殖,细胞突起丰富,相互交联成网。移植细胞与周围骨组织交界清楚。可见红细胞等血肿成分。未见大量淋巴细胞浸入。对照组主要为血肿成分。

2.2.2 术后第1周: 实验1组可见间质细胞集中区域有成堆成群的幼稚软骨细胞,软骨细胞亦有条索状分布,条索之间可交联成网状,形成骨小梁的雏形。2组亦出现幼稚软骨细胞,但细胞群中数目较少,多成细胞团排列。对照组血肿多开始机化,可见骨膜细胞从缺口处长入,典型软骨细胞极少。实验组均未见淋巴细胞大量浸入。

2.2.3 术后第2周: 第1组可见软骨细胞增生肥大,部分细胞周围有钙化及新骨形成,可见典

型的呈网状结构的骨小梁形成。第2组亦可见条索状联结成网状的软骨细胞群,部分区域软骨细胞群中可见软骨细胞增生肥大钙化,有少数骨小梁形成。实验组骨缺损内新生骨组织已开始向周围骨组织伸出伪足样结构,新旧骨间呈嵌合状联结,但彼此境界清楚。对照组亦出现少量以骨细胞为主的骨小梁结构,软骨细胞较少这些骨小梁多与骨外膜有移行。各组均未见淋巴细胞浸入。

2.2.4 术后第4周: 各组均可见典型的骨小梁结构。但是实验组骨小梁以网结构为主,部分区域内可见骨髓腔形成。而对照组主要为孤立的、岛屿状骨小梁,联成网的骨小梁很少。实验组新生骨已与受体骨紧密相连,两者骨小梁间联成网,新骨小梁与受体骨皮质间则形成粘合线样结构。

2.3 骨组织形态计量学检查: 骨组织形态计量学参数均显示术后第1、2和4周第1、2和3组之间的差别。其中第1、2周测量时将软骨细胞团,条索状结构计入骨小梁结构项上,见表2。

表2 移植术后骨组织形态计量学变化

项目	分组	1周后	2周后	4周后			
骨小梁体积比: (%)	1	12.5±5.8*	27.7±12.4*	35.7±19.0**			
		2	2.5±1.2*	18.6±10.6*	28.5±17.5*		
		3		12.0±6.9	23.8±18.1		
	平均骨小梁宽度: (μm)	1	23.7±10.5**	35.5±20.3*	37.1±15.3*		
			2	23.1±9.5*	31.8±21.2*	39.5±20.7*	
			3		21.5±17.4	25.8±16.5	
		成骨细胞表面积比: (%)	1	50.4±17.5**	76.4±13.0**	51.7±26.2*	
				2	78.9±14.7*	71.2±17.3*	52.4±28.5*
				3		40.6±18.7	38.1±25.1

注: *第1或2组与3组相比 $P < 0.05$; **第1组与2或3组相比 $P < 0.05$

3 讨论

绝经后妇女及老年人均存在不同程度的骨质疏松,并且随年龄增长而不断加重,易继发难以愈合的骨折。其原因之一在于年老后,机体内骨系细胞活性降低,其退行性变随着年龄的增长而递增,骨质形成能力下降^[1],治疗上用多种措施均难以刺激老年骨的骨质形成^[2]。近年来,Tiedeman 等人用自体骨髓与脱钙骨基质的混合物经皮注射治疗骨不连,证实其效果优于松质骨移植,并认为骨髓成分中主要是骨髓间质细胞起作用^[3],但上述作者只对年轻动物进行了研究。而年老以后,这些细胞数目减少,活性降低,用于移植则意义不大,况且输入全骨髓成分易导致受体与移植植物之间的排斥反应,所以,本实验中,用经短期体外培养纯化的幼龄 SD 系大鼠骨髓间质细胞移植于同种老年鼠骨缺损内,显示年轻细胞注入老年体内后仍然保存较强的活力,移植细胞能在局部生存,生长和成骨,使细胞移植部位骨缺损修复快,形成高质量的联结成网状的骨小梁样结构。

骨质疏松性骨折愈合困难除与骨细胞活性降低有关外,亦与衰老骨内骨形态形成蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)含量下降有关。BMP 可激活骨髓间质细胞,促进细胞内 DNA 合成,加快分裂繁殖活动。本实验中, BMP 与骨髓间质细胞联合移植组成骨作用显著强于单独细胞移植组。并且未见明显排斥反应。

对于细胞移植,有人认为由于细胞的裸露会增加排斥强度,有的学者持相反的意见^[9]。本实验属同种系异体移植,并联合应用了异种蛋白质——BMP,但未出现明显排斥反应。移植年轻活性强的骨系细胞,尤其是联合应用 BMP,以替代治疗局部骨质疏松症及其骨折可能是一种非常有效而副作用小,简单易行的手段。动物实验的成功,必将促进我们进行深入的临床应用研究。

参 考 文 献

- 1 Tonna EA. Electron microscopic study of bone surface changes during ageing, the loss of cellular control and biofeedback. *J Gerontol*, 1978, 33: 163.
- 2 Nordin BEC, Need AG, Morris HA, et al. New approaches to the problem of osteoporosis. *Clin Orthop*, 1985, 200: 181.
- 3 Sato K, and Urist MR. Bone morphogenetic protein induced cartilage development in tissue culture. *Clin Orthop*, 1984, 183.
- 4 Prolo DJ, and Rodrigo JJ. Contemporary bone graft physiology and surgery. *Clin Orthop*, 1985, 200: 322.
- 5 丘钜世, 文剑明, 张萌, 等. 人骨髓间质细胞的培养及 4-NQ 诱发其恶性转化的试验. *中华骨科杂志*, 1992, 12(2): 144.
- 6 Urist MR. Morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1979, 76(2): 3511.
- 7 刘子君主编. 骨关节病理学, 第一版. 北京: 人民卫生出版社, 1992 年, 474.
- 8 Tiedeman JJ, Connolly JF, Strates BS, et al. Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix; an experimental study in dogs. *Clin Orthop*, 1991, 268: 294.
- 9 夏德生. 全面开展细胞移植研究与应用. *中华器官移植杂志*, 1990, 11(4): 1.

第四届全国骨质疏松研讨会征文

第四届全国骨质疏松研讨会决定在 1996 年 10 月 21--26 日在河南省洛阳市举行。会上将进行优秀论文评选和颁奖。一等奖 1000 元 5 名, 二等奖 500 元 10 名, 优秀奖 200 元 20 名。

征文内容: 骨质疏松的诊断与骨矿测量; 骨质疏松的流行病学研究; 骨质疏松的中西治疗; 骨质疏松的预防; 骨质疏松基础研究。**征文要求:** 3200 字以内的论文全文及 500 字以内的摘要各 1 份; 来稿要求打印或用稿纸书写; 来稿必须未公开发表过, 须经单位审核并加盖公章; 征文截止日期 1996 年 6 月 31 日(邮戳为准)。征稿请寄: 100029, 北京市朝阳区胜古北里一号, 中国老年学学会骨质疏松委员会, 中国骨质疏松杂志社 孙继荣 刘京萍 收。