

网络出版时间: 2017-1-20 11:13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170120.1113.006.html>

富白细胞和血小板纤维蛋白凝胶对 BMSCs 在兔股骨头缺血性坏死中成骨作用的影响

方 晟¹, 方家刘², 方 晓¹, 王康康¹, 尹宗生¹

摘要 目的 观察富白细胞和血小板纤维蛋白凝胶(L-PRF)联合骨髓间充质干细胞(BMSCs)在兔股骨头缺血性坏死(ANFH)试验中对成骨作用的影响。方法 48只新西兰白兔随机分为A、B、C、D4组(各组12只),均造双侧ANFH模型。后给予ANFH修复方法:A组单纯行髓芯减压;B组行髓芯减压联合L-PRF凝胶移植;C组行髓芯减压联合BMSCs移植;D组行髓芯减压联合BMSCs和L-PRF凝胶移植。A、B、C、D组于术后4、8、12周摄X片后,每组随机选取4只行相关组织学检查、新生骨体积分数、新生血管计数、X射线评分。结果 各组股骨头坏死中呈现不同程度的新骨形成。C、D组新骨的体积分数,血管计数及X射线评分较A、B组差异显著,其中D组比其余各组均高,B组强于A组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 L-PRF凝胶在医治兔ANFH模型中对BMSCs成骨有促进作用,并拟使用L-PRF凝胶和BMSCs兼骨髓芯减压治疗ANFH提供理论

指导。

关键词 股骨头缺血性坏死;髓芯减压;骨髓间充质干细胞;富血小板纤维蛋白

中图分类号 R 681.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)01-0027-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.006

股骨头缺血性坏死(avascular necrosis of femoral head, ANFH)是指因各种病因致股骨头内压力增加,骨内动静脉栓塞,血流缺失,骨组织变性坏死,持续进展,关节面塌陷,股骨头变扁,囊性变,关节严重破坏,腹股沟及髋部疼痛、不适,运动功能障碍等,是临床常见的一种疾病^[1]。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是具有多种分化潜能和自我更新的原始细胞,并能分泌多种成骨活性因子,促进骨质和血管的再生^[2]。富白细胞和血小板纤维蛋白凝胶(leucocyte and platelet-rich fibrin gel, L-PRF)2001年由法国科学家 Choukroun et al^[3]发现,是新一代血液浓缩制品,能分泌多种生长因子,具有抗感染、生理性支架作用,被定义为自体的白细胞和富血小板纤维蛋白生物材料。该研究探讨

2016-09-09 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171173)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院骨科,合肥 230022²安徽医科大学第二附属医院骨科,合肥 230022

作者简介:方 晟,男,硕士研究生;

尹宗生,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: yinzongsheng1961@sina.com

Expression and significance of ESM-1 in hypoxia-induced human gastric cancer cells

Chen Shaolong, Wei Xiang, Wang Yi, et al

(Dept of Biochemistry and Laboratory of Molecular Biology, Anhui Medical University;

Dept of Key Laboratory, Gene Resource Utilization for Severe Disease of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of CoCl_2 -induced chemical hypoxia on proliferation of human gastric carcinoma SGC-7901 and BGC-823 cells, and to study the expression of ESM-1 in the different degrees of hypoxia gastric carcinoma cells. **Methods** SGC-7901/BGC-823 cells were treated with 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.6 mmol/L CoCl_2 for 24 hours. The expressions of HIF-1 α and ESM-1 were detected by Western blot. The change of cell proliferation was detected by MTS. **Results** Cobalt dichloride at the concentration lower than 0.6 mmol/L had no significant effect on proliferation of gastric carcinoma cell line SGC-7901 and BGC-823 cells. The Western blot analysis illustrated that the expression of ESM-1 declined obviously as the expression of HIF-1 α increased. **Conclusion** 0.5, 0.6 mmol/L Cobalt dichloride can induce cell hypoxia. ESM-1 is negatively correlated with HIF-1 α .

Key words gastric carcinoma cell; hypoxia; ESM-1; hypoxia inducible factor

髓芯减压同时使用 L-PRF 凝胶和 BMSCs 对 ANFH 动物模型中成骨作用的影响,为将来临床治疗 ANFH 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 3~7 月龄新西兰白兔 48 只,2.0~2.8 kg,由安徽医科大学实验动物中心提供;胎牛血清(FBS,美国 GIBCO 公司);胰蛋白酶(上海鼎国生物技术有限公司);DMEM/F12 培养基(美国 HyClone 公司);CD29、CD31、CD4 及 CD90 单抗(美国 Sigma 公司);10% 胎牛血清(美国 Gibco 公司);CO₂ 孵箱(美国 Harris 公司);超速离心机(美国 Thermofisher 公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);Image-Pro Plus 6.0 软件(美国 Media Cybernetics 公司);MDGS 软件(德国 Zeiss 公司)。

1.2 实验方法 选择健康的 3~7 月龄新西兰白兔 48 只,2.0~2.8 kg,雌雄不拘。随机分为 A、B、C、D 4 组(各 12 只),均造双侧 ANFH 模型。后给予 ANFH 修复方法:A 组单纯行髓芯减压;B 组行髓芯减压联合 L-PRF 凝胶移植;C 组行髓芯减压联合 BMSCs 移植;D 组行髓芯减压联合 BMSCs 和 L-PRF 凝胶移植。

1.2.1 L-PRF 凝胶制备 B、D 组每只兔实验前于心脏部位备皮,铺巾。于心跳最强处抽血 5 ml,并置于 5 ml 玻璃离心管中,2 700 r/min 离心 15 min,静置 12 min 弃去上清液和底层的红细胞,取出中间部分,即获取 L-PRF 凝胶。

1.2.2 兔 BMSCs 分离与培养 C、D 组使用 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉后,备皮、消毒、铺巾,于两侧髂后上嵴处穿刺抽取骨髓 5 ml,置入离心管内,离心 20 min 并经密度梯度离心后,收集梭形单核细胞层,洗涤后加入培养瓶中,37℃、5% CO₂ 条件下,在含有 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基中培育,取第 3 代 BMSCs,在移植前经过消化、洗涤、离心,计数,取 6 × 10⁶ /ml 浓度的悬液以备移植。

1.2.3 BMSCs 表型鉴定 BMSCs 第 2 代传第 3 代时,部分细胞接种于 6 孔板中,消化、离心、冲洗、垂悬、固定,封闭处理后,加入 CD29、CD31、CD45 及 CD90 流式细胞仪进行检测分析。

1.2.4 ANFH 模型制备 48 只兔均制备双侧 ANFH 模型,3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)兔耳缘静脉麻醉后作双髌关节前外侧入路,逐层分离至兔股骨头颈外侧偏前,Light Bulb 方法^[4]开窗。使用无菌 3.5 mm 电钻头钻孔深达约 4.0 mm 入股骨头。刮除大

部分松质骨,约占头部总体积的 40%~70%,不穿透股骨头达软骨下层。用棉签头浸满液氮迅速放入股骨头钻孔处,持续 20 s 共 20 次,便造成股骨头内骨组织变性坏死。

1.2.5 股骨头坏死修复方法 A 组:双侧 ANFH 造模成功后逐层缝合;B 组:双侧 ANFH 造模成功后立即剪取制备好的 50 μl L-PRF 凝胶植入股骨头钻孔内,逐层缝合;C 组:双侧 ANFH 造模成功后立即吸取制备好的 50 μl BMSCs 细胞悬液植入股骨头钻孔内,逐层缝合;D 组:双侧 ANFH 造模成功后,立刻剪取制备好的 50 μl L-PRF 凝胶和吸取 50 μl BMSCs 细胞悬液植入股骨头钻孔内,逐层缝合。于兔臀大肌处注射抗生素(硫酸庆大霉素 2 ml/只,1 次/d,共 3 d)预防感染。

1.2.6 观察指标 于术后第 4、8、12 周,每组随即选取 4 只兔麻醉后,取平卧位摄骨盆正位 X 线片,比较骨坏死灶的密度和组织病理改变,新骨产生用 Lane-Sandhu X 射线评分^[5]。摄 X 线片后,随机选取每组 4 只,处死后取出股骨头标本,固定 48 h。硝酸液中脱钙约 2 周,包埋、切片、染色,显微镜下观察坏死和修复情况同时对新生血管进行计数。镜下随机取 10 个视野进行计数。并通过 Image-Pro Plus 6.0 和 MDGS 软件进行图像分析,计算新形成骨组织在坏死区所占的体积百分比。

1.3 统计学处理 资料收集整理后,应用 SPSS 21.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用 SNK 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 L-PRF 凝胶形态 富白细胞和血小板纤维蛋白凝胶为半透明白色胶冻状(图 1),位于离心管 3 层中的中间层,上层是透明的血清,下层为红细胞。



图 1 L-PRF 凝胶形态

2.2 BMSCs 鉴定结果 BMSCs 培养至第 3 代呈贴壁梭形(图 2),流式细胞仪测试表明:CD31 阴性,

CD45 阴性 ,CD29 阳性 ,CD90 阳性 ,确定为 BMSCs。

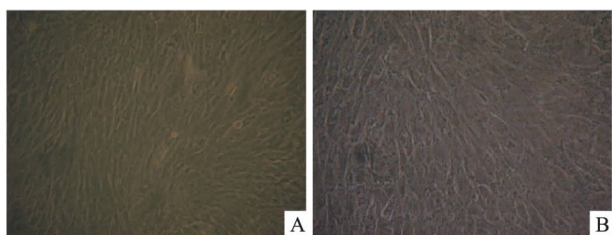


图2 BMSCs 形态学鉴定

A: ×100; B: ×400

2.3 ANFH 动物情况观察 所有实验动物无死亡,均进入结果分析,术后当日进食,切口无红肿、渗液、无感染, I 期愈合。

2.4 影像学观察结果 X 线片观察治疗效果: A 组坏死区密度低,大量囊性变; B 组坏死区密度低,部分囊性变; C 组坏死区密度有所增高,骨小梁零星; D 组坏死区与正常骨质无太大差别,骨小梁结构存在。X 射线评分情况显示:第 4、8、12 周时, C、D 组的新骨强于 A、B 组, D 组的新骨强于 C 组, B 组的新骨强于 A 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.5 组织学结果

2.5.1 每组坏死区内组织学观察 A 组第 4 周:坏死区有稀少成骨细胞,骨小窝内细胞萎缩,纤维细胞丛生;第 8 周:边沿区少量新骨,纤维肉芽组织生成;第 12 周:边沿区可见骨壁,主要是纤维肉芽。B 组第 4 周:坏死区有少量成骨细胞,多量纤维细胞丛生,边沿区少量新骨;第 8 周:边沿区有少量新骨,新骨细胞向负重区延伸;第 12 周:边沿区有骨条,负重区新生骨稀疏。C 组第 4 周:坏死区有部分成骨细胞,部分类骨质出现;第 8 周:坏死区有初生骨小梁;第 12 周:边沿区骨条渐多,负重区新生骨进一步增加。D 组第 4 周:坏死区有大量成骨细胞,边沿区有成熟骨小梁和原始细小血管出现;第 8 周:坏死区有编织骨小梁,层状骨小梁,和丛生的毛细血管;第 12 周:坏死区的骨小梁增宽变致密,血管数量增加。见图 3。

2.5.2 坏死区内新骨形成与新生血管数量分析 MDGS 软件计算坏死区新生骨所占百分比与新生血管计数显示:第 4、8、12 周时, C、D 组的新骨及血管数强于 A、B 组, D 组的新骨及血管数强于 C 组, B 组的新骨及血管数强于 A 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2、3。

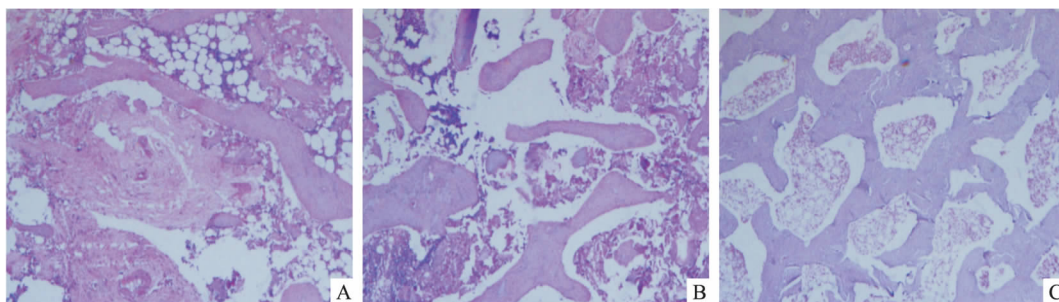


图3 组织学观察(D组) HE ×100

A: 第 4 周; B: 第 8 周; C: 第 12 周

表 1 每组各时间点 X 射线评分对比 ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

时间	A 组	B 组	C 组	D 组	F 值
4 周	1.70 ± 0.37 ^{#Δ}	2.74 ± 0.68 ^{* Δ}	3.79 ± 0.84 ^{* #}	5.05 ± 0.66 ^{* #Δ}	47.840
8 周	1.76 ± 0.25 ^{#Δ}	3.48 ± 0.72 ^{* Δ}	5.50 ± 0.86 ^{* #}	7.25 ± 0.73 ^{* #Δ}	146.680
12 周	2.04 ± 0.22 ^{#Δ}	3.78 ± 0.83 ^{* Δ}	6.20 ± 0.81 ^{* #}	7.85 ± 0.85 ^{* #Δ}	166.560

与 A 组比较: * $P < 0.05$; 与 B 组比较: # $P < 0.05$; 与 C 组比较: Δ $P < 0.05$

表 2 每组各时间点新骨面积比值对比 ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

时间	A 组	B 组	C 组	D 组	F 值
4 周	15.8 ± 0.8 ^{#Δ}	30.2 ± 1.8 ^{* Δ}	43.2 ± 1.4 ^{* #}	63.4 ± 2.5 ^{* #Δ}	22 112.200
8 周	22.0 ± 1.0 ^{#Δ}	46.0 ± 2.4 ^{* Δ}	72.1 ± 1.2 ^{* #}	82.6 ± 2.1 ^{* #Δ}	23 210.600
12 周	25.0 ± 1.1 ^{#Δ}	52.0 ± 2.6 ^{* Δ}	79.3 ± 2.5 ^{* #}	87.2 ± 2.6 ^{* #Δ}	23 950.500

与 A 组比较: * $P < 0.05$; 与 B 组比较: # $P < 0.05$; 与 C 组比较: Δ $P < 0.05$

表3 每组各时间点血管数量对比 (n = 12, $\bar{x} \pm s$)

时间	A 组	B 组	C 组	D 组	F 值
4 周	2.56 ± 0.57 ^{#Δ}	2.65 ± 0.69 ^{* Δ}	3.23 ± 1.02 ^{* #}	5.00 ± 0.75 ^{* #Δ}	42.180
8 周	2.42 ± 0.19 ^{#Δ}	3.01 ± 0.56 ^{* Δ}	4.90 ± 0.97 ^{* #}	7.05 ± 1.04 ^{* #Δ}	146.680
12 周	2.65 ± 0.38 ^{#Δ}	3.42 ± 0.66 ^{* Δ}	5.022 ± 1.00 ^{* #}	7.45 ± 1.24 ^{* #Δ}	128.550

与 A 组比较:^{*} P < 0.05; 与 B 组比较:[#] P < 0.05; 与 C 组比较:^Δ P < 0.05

3 讨论

针对 ANFH 早期有很多治疗方法,保守治疗方法有^[6-7]:药物、脉冲、体外磁场治疗。手术治疗方法有^[8]:髓芯减压、截骨术、植骨术、髋关节表面置换、髋关节置换术。近几年来应用的生长和分化因子等治疗有^[9]:骨形态发生蛋白(BMP)、BMSCs、肝细胞生长因子。富血小板血浆联合其他手术方法减轻骨头内部的压力^[10],增强股骨头坏死部位新骨的形成和血管的再生,推迟骨坏死的进程,达到初步治愈 ANFH 的目的。虽然方法众多,最终结果却各异。

髓芯减压在临床上医治早期 ANFH,从使用 8 ~ 12 mm 的粗钻头钻 1 个隧道进行减压,到现在流行使用 3.2 ~ 3.6 mm 的细钻头钻 2 ~ 3 个细孔来进行髓芯减压,即减少了对骨质的破坏又减轻了股骨头坏死部位的压力,促进了血液循环,缩短手术时间,减轻二次创伤等优点,并避免了粗钻头钻孔导致股骨头塌的问题^[11]。

L-PRF 凝胶至今已有 40 多年的研究历史^[12],最早是从 1970 年首次使用纤维凝胶治疗皮肤缺损并取得一定的疗效,强调纤维凝胶中纤维蛋白对皮肤缺损的再生修复作用。1975 ~ 1979 年不少研究者提出了更新的概念:称为血小板纤维蛋白原凝血酶混合物或者凝胶血小板,这也就是富血小板凝胶概念的最早雏形,并利用凝胶血小板治疗角膜穿透伤,并在眼科、神经外科、普外科等学科应用。1986 年利用血小板中的血小板诱导愈合因子成功治愈慢性顽固性皮肤溃疡,其强调血小板释放的生长因子对组织的再生作用。1997 ~ 1998 年,开始把血小板纤维蛋白应用于口腔和颌面部外科,并强调血小板释放的生长因子对组织的再生修复作用。于此同时正式确立了富血小板纤维蛋白的概念,这项制备方法完全有别于以往其他方法,其不仅强调了血小板分泌的因子,还强调了纤维蛋白的生理性的三维支架,以及不添加外源性的凝血酶,防止机体排异反应,减少感染概率以及阻止了凝血功能障碍,被称之为第 2 代的水小板浓缩物。2006 年至今,科学家们

提出富白细胞和血小板纤维蛋白概念并应用于运动医学,其强调了循环血液中的细胞特别是白细胞的作用。从早期利用单纯的纤维蛋白网络支架作用,到血小板释放的生长因子的治愈特性,最终到强调白细胞及其三者相互作用,促进细胞再生和血管形成的作用,并应用于临床众多学科和治疗各种疾病。

BMSCs 位于骨髓组织中,是具有多分化功能的原始细胞,采集、培育方便,增殖、分化受各种因子的调控,也能分泌多种成骨因子,自体移植几乎无排异,安全性高,是临床应用中不可缺少的细胞。

本研究利用自体 L-PRF 凝胶和 BMSCs 兼并髓芯减压能促进坏死区新骨的形成和修复,通过四组间的比较,D 组应用 L-PRF 凝胶和 BMSCs 的新骨形成和血管再生能力明显强于其余 3 组,C 组 BMSCs 强于 B 组 L-PRF 凝胶,虽然 B 组和 C 组也有一定的新骨新成和血管再生,但是其数量和组织排列还不成熟,A 组单纯的髓芯减压新骨形成和血管再生稀少,原因可能是机体组织的再生不能仅仅依靠单方面的因素。现代的组织再生工程学提出了机体再生的 3 个关键因素:种子细胞、优良的支架、信号分子。本实验中 BMSCs 作为种子细胞促进成骨细胞的再生,L-PRF 凝胶作为生理的支架,利用血小板和白细胞释放的信号因子,三者共同作用加速了新骨和血管的再生,从而有利于早期 ANFH 的治愈。

综上所述,L-PRF 凝胶和 BMSCs 联合髓芯减压比单一应用 L-PRF 凝胶、BMSCs 或仅髓芯减压治疗早期的 ANFH 具有更优良的效果,而且操作简便。但对富白细胞和血小板纤维蛋白更详细的分类和进一步研究哪种生长因子在治疗中起具体作用,L-PRF 凝胶和 BMSCs 在修复股骨头坏死实验中何者为主导等问题还须进一步探讨。

参考文献

[1] Moya-Angeler J, Gianakos A L, Villa J C, et al. Current concepts on osteonecrosis of the femoral head [J]. World J Orthop 2015, 6 (8):590-601.

[2] Zhao D, Cui D, Wang B, et al. Treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head with autologous implantation of bone marrow-derived and cultured mesenchymal stem cells [J]. Bone 2012,

- 50(1):325-30.
- [3] Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, et al. Une opportunit en para-implantologie: le PRF [J]. *Implantodontie* 2000, (42):55-62.
- [4] Mont M A, Einhorn T A, Sponseller P D, et al. The trapdoor procedure using autogenous cortical and cancellous bone grafts for osteonecrosis of the femoral head [J]. *J Bone Joint Surg Br* 1998, 80(1):56-62.
- [5] Lane J M, Sandhu H S. Current approaches to experimental bone grafting [J]. *Orthop Clin North Am* 1987, 18(2):213-25.
- [6] Albers A, Carli A, Routy B, et al. Treatment with acetylsalicylic acid prevents short to mid-term radiographic progression of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: a pilot study [J]. *Can J Surg* 2015, 58(3):198-205.
- [7] Maruotti N, Corrado A, Neve A, et al. Bisphosphonates: effects on osteoblast [J]. *Eur J Clin Pharmacol* 2012, 68(7):1013-8.
- [8] Brown T D, Pedersen D R, Baker K J, et al. Mechanical consequences of core drilling and bone-grafting on osteonecrosis of the femoral head [J]. *J Bone Joint Surg Am* 1993, 75(9):1358-67.
- [9] Houdek M T, Wyles C C, Sierra R J. Osteonecrosis of the femoral head: treatment with ancillary growth factors [J]. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2015, 8(3):233-9.
- [10] 方家刘, 尹宗生, 王伟, 等. 富白细胞及血小板血浆对 BMSCs 在兔股骨头坏死中成骨作用的影响 [J]. *中国修复重建外科杂志* 2015, 29(2):227-33.
- [11] Mont M A, Ragland P S, Etienne G. Core decompression of the femoral head for osteonecrosis using percutaneous multiple small-diameter drilling [J]. *Clin Orthop Relat Res* 2004, 429(429):131-8.
- [12] Dohan Ehrenfest D M, Andia I, Zumstein M A, et al. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives [J]. *Muscles Ligaments Tendons J* 2014, 4(1):3-9.

Effects of de novo bone formation using autologous leucocyte and platelet-rich fibrin with bone marrow mesenchymal stem cells in avascular necrosis of femoral head in rabbits

Fang Sheng¹, Fang Jialiu², Fang Xiao¹, et al

¹Dept of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Orthopedics, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To evaluate de novo bone formation by using autologous leucocyte and platelet-rich fibrin gel (L-PRF) with bone marrow stromal cells (BMSCs) and core decompression in treating femoral head necrosis in rabbits. **Methods** We made animal models of avascular osteonecrosis of the femoral head and divided them into 4 groups randomly, Group A: core decompression; Group B: core decompression with implantation of L-PRF; Group C: core decompression with implantation of autologous BMSCs; Group D: core decompression with implantation of autologous BMSCs and L-PRF. Four rabbits selected from each group were sacrificed 4, 8, 12 weeks after the operation then they were taken radiological photography and all specimens were harvested histological evaluations. **Results** We investigated the process of de novo bone formation on images of radiology and histology. There showed excellent differences in the progress of the new bone formation, new blood vessel count in groups C and D comparing with groups A and B. Especially group D had significant osteogenesis ($P < 0.05$). **Conclusion** Core decompression with autologous leucocyte and platelet-rich fibrin and BMSCs is an effective and feasible method to treat early avascular osteonecrosis of femoral head in rabbit.

Key words avascular osteonecrosis of femoral head; core decompression; bone marrow stromal cells; leucocyte and platelet-rich fibrin