

间充质干细胞在骨伤疾病治疗中的应用

谭远超¹ Kevin² 姜红江¹ 黄相杰¹ 周纪平¹

(1 山东省文登整骨医院, 264400 ; 2 美国 NeoStem Inc)

摘要: [目的] 骨髓间充质干细胞 (BM-MSCs) 通过贴壁培养的方法可以分离得到骨髓间充质干细胞。在原代培养 2~3 周后, 大多数造血干细胞死亡, 剩下的即为骨髓间充质干细胞 (BM-MSCs)。基于其强大的分化潜能及易于分离培养、遗传相对稳定的特性, 使其在组织工程、细胞治疗方面得到了日益广泛的应用, 本文就其在骨伤疾病治疗中的最新应用技术 (AOT 技术) 加以阐述。[方法] 详细介绍了 AOT 技术的适应症、禁忌症、可能的不良反应、技术特点以及注射治疗方法、质量保证体系和病例报告。[结果] 治疗 58 例患者以来均取得了较好的治疗效果。[结论] 由于 BMSCs 具有能够快速扩增和多向分化等特点, 使其成为再生医学中一个非常引人注目的工具。在骨伤科展示了光明的应用前景。随着对 BMSCs 的深入研究, 一些现在难以治愈的疾病, 将来有可能采用新的方法得到很好的治疗。

关键词: 间充质干细胞, 骨伤疾病, 应用

干细胞是指存在于组织中数目很少的一些分化相对静止的细胞 (resting cell)。这些细胞具有两个方面的重要潜能特点, 即具有不对称性细胞分裂的能力和自我更新的能力。1867 年德国科学家 Cohnheim 在研究创伤愈合时提出了骨髓中存在非造血干细胞的观点。1976 年 Friedenstain 等^[1] 以确凿的证据证实骨髓中除含有造血干细胞外, 还含有集落形成的成纤维祖细胞或成纤维集落形成单位, 这些细胞在体内处于休眠状态, 而在体外适当条件的刺激下可以进入细胞周期, 从而形成类似于骨或软骨碎片的细胞集落, 这种细胞称为骨髓间充质干细胞 (bonemarrow mesenchymal stem cells, BMSCs)。Friedenstain 等^[1] 于 1987 年又发现在塑料培养皿中培养的贴壁的骨髓单个核细胞在一定条件下可分化为成骨细胞、成软骨细胞、成脂肪细胞和成肌细胞, 而且这些细胞扩增 20~30 代后仍保持其多项分化潜能, 其连续传代培养或冷冻保存后仍具有多项分化潜能, 而且可以保持正常的核型和端粒酶活性, 但不能自发分化^[2]。只有在体外特定的诱导条件下, 可以向成骨细胞、软骨细胞、肌细胞、神经细胞等方向分化。基于这种强大的分化潜能及易于分离培养、遗传相对稳定

的特性,使其在组织工程、细胞治疗方面得到了日益广泛的应用,在骨伤科领域也显示出了其不同于传统治疗方式的优越性。骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)通过贴壁培养的方法可以分离得到骨髓间充质干细胞。在原代培养 2~3 周后,大多数造血干细胞死亡,剩下的即为骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)。

1 干细胞的研究现状

近 20 来,干细胞研究一直是生命科学中的热点,其研究内容几乎涉及所有生命科学的生物医学领域,除了在细胞治疗、组织器官移植和基因治疗中发挥重要作用外,还在发现新基因、基因功能分析、发育生物学模型及新药开发等方面产生重要影响。

1999 年,《Science》杂志编者 Bloom 说:“干细胞给人类提供了极大的可能性:用干细胞修复病损的脏器和细胞缺损”,他还说“最终可能用干细胞制成像肾、肝这样复杂的器官”。《Science》杂志 1999 年将“干细胞研究的新发现”列入十大科技进展之首;2002 年列入最值得关注的六大科技领域之一;美国加州每年提供干细胞研究经费达 3 亿美元。2009 年 1 月,美国最大的干细胞公司宣布,骨髓间充质干细胞成为世界上第一个获准的干细胞治疗产品,引起不小轰动,这一进展在干细胞领域无疑也是一次里程碑式的飞跃。由美国肌肉骨骼,脊髓和神经损伤领域的国际知名专家桑迪诺(Christopher Centeno)博士发明的 AOT 技术为干细胞治疗骨伤疾病提供了一条新的途径。

2 什么是 AOT 技术

AOT (autologus osteo therapy)技术,即自体骨髓间充质干细胞骨伤疾病治疗技术。是由美国肌肉骨骼,脊髓和神经损伤领域的国际知名专家桑迪诺(Christopher Centeno)博士发明的。美国 ABC, CBS 等最大的电视台都曾对其技术进行专题访问报道。即通过释放患者自身干细胞的力量来达到治疗股骨头坏死、骨性关节炎、骨不连、椎间盘突出以及由运动造成的肌腱、韧带和半月板损伤等骨病的目的。

2.1 AOT 技术适应症 (1) 骨折延期愈合及不愈合;(2) 骨坏死(如股骨头坏死 I 期和 II 期);(3) 剥脱性骨软骨炎、软骨缺损;(4) 老年骨性关节炎;(5) 创伤性关节炎;(6) 半月板损伤;(7) 肌腱、韧带损伤;(8) 椎间盘损伤。

2.2 AOT 技术禁忌证 (1) 身体健康较差,合并有高血压、糖尿病、心脏病等器质性病变;(2) 骨髓成骨能力较差不适宜自体干细胞移植;(3) 有骨肿瘤和凝血功能障碍。

2.3 可能的不良反应 在治疗中或者治疗后可能出现的并发症:(1) 极个别患者注射干细胞后可能发生疼痛和肿胀,可进行关节积液引流;(2) 骨髓穿刺感染,操作过程中应防止此类情况发生,如发生可用抗菌素。

2.4 AOT 技术的主要特点 (1) 自体培养,安全可靠:干细胞来自自体骨髓,干细胞的体外,培养使用患者自体血小板裂解液,不使用任何外来的细胞培养生长因子。这就最大限度地保持干细胞处于体内状态,保持干细胞不产生变异;(2) 程序规范,标准严格:实验室和临床程序正规完整,严格按照美国国际细胞医疗协会(ICMS)和中国国家中药管理局的标准进行操作;(3) 微创,痛苦很小:临床治疗创伤轻微,患者痛苦小。患者不需长期住院,不用陪护;(4) 质量保证,无排异反应:具有严格的干细胞质量检测程序,包括染色体变异的核型检测,尚属国内独家。由于完全自体,无免疫排异和传染疾病等问题。

2.5 注射治疗方法 (1) 标准(Standard)——用于各种轻度骨性关节炎等;(2) 累加(Layering)——用于各种中度以上骨性关节炎等;(3) 缺血性坏死(AVN)——用于缺血性股骨头坏死等;(4) 肌腱/韧带(Tendon/Ligament)的损伤治疗程序;(5) 颈椎(Disc)的损伤治疗程序;(6) 髋关节(Hip)的损伤治疗程序。

2.6 质量控制措施和质量保证 (1) 冷冻样本的质量保证:利用液氮进行细胞的长期保存(一般超过 3 个月)。为了确保冷藏样本的质量,最少每个月要随机抽取样本进行质量检测。检测的方法为:① 革兰氏染色测试;② 细菌培养的检测。(2) MSCs 生长群落级别的鉴定:从 P1 开始,在每一次细胞继代培养过程中,经过显微镜的观察,都要记录下细胞群落的生长级别(Katsube 方法),分为 A, B,

C, D; (3) MSCs 表面因子的测试: MSCs 具有自己独特的细胞表面因子抗原, 其基本表现形式为 +CD166/+CD73/+CD105/ -CD34。MSCs 表面因子的分析可以保证细胞群体的质量; (4) 细胞遗传学染色体变异分析: 也叫细胞核型分析, 是对细胞进行染色体结构变异的分析。由于干细胞具有多向性的分化以及细胞体外培养的特性, 在 MSCs 临床注射前 (P2) 进行染色体的核型分析以确保 MSCs 的质量标准。

3 AOT 技术在文登整骨医院的成功应用

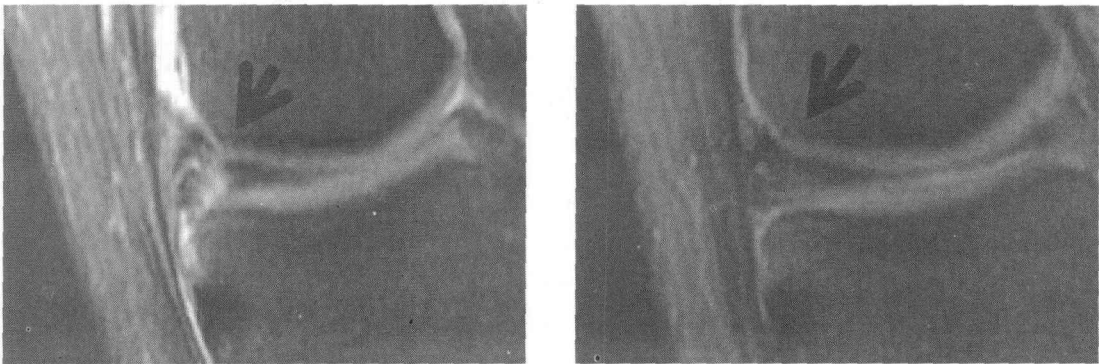
2008 年至 2009 年 6 月, 桑迪诺博士曾 3 次来文登整骨医院洽谈技术合作; 山东文登整骨医院 2009 年 6 月由美国桑蒂诺-舒尔茨医学中心引入 AOT 技术; 除美国外, 文登整骨医院是世界上第一家进行此技术应用的。2009 年 6 月至 2009 年 12 月, 主要是实验室建设, 组建专家团队和组织技术人员赴美国接受培训; 2010 年 1 月至 2010 年 5 月, 干细胞实验室试运行阶段, 建立所有操作程序的标准 SOP; 2010 年 6 月至今, 干细胞治疗中心正式开诊, 共治疗各类病患 58 人, 取得了良好的治疗效果。

典型病例报告:

1 内侧半月板复杂撕裂 AOT 治疗后 13 个月半月板垂直撕裂部分基本修复。

治疗前

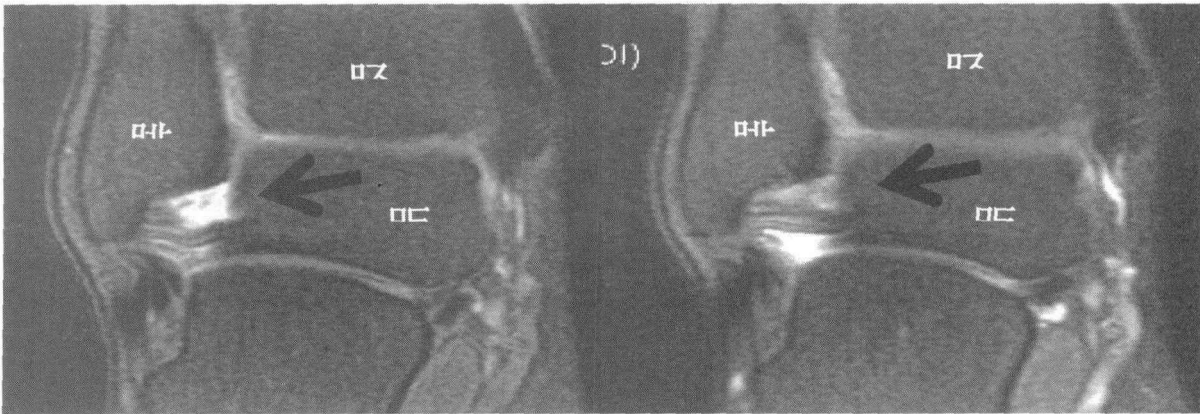
治疗后



2 踝部骨病 32 岁女性, 由于摔倒造成脚踝部多年剧痛。关节镜清创、类固醇治疗、理疗等各种疗法均无明显效果。注意: 距-腓韧带经该项技术治疗显示修复, 病人疼痛消失。

治疗前

治疗后



3 椎间盘突出 28 岁女性, 椎间盘切除微创手术失败, 多年腰背疼痛及阵发性神经根病变。左图为干细胞治疗 1 月后, 右图为 3 月后。注意: 左图椎间盘后突在右图中已经平坦。椎管直径由 1.0cm 增加到 1.2cm。

