

自体骨髓间充质细胞移植治疗骨折延迟愈合或不愈合 69 例

张中禹¹ 谭勇海¹ 鞠昌军¹ 姜红江^{1△}

[摘要] **目的:**探讨自体骨髓间充质细胞移植治疗骨折延迟愈合或不愈合的临床疗效。**方法:**自 2012 年 5 月至 2016 年 8 月,采用自体骨髓间充质细胞治疗骨折延迟愈合或不愈合患者 69 例,均为手术治疗后无感染性不愈合患者。抽取患者自身骨髓,通过分离、培养和扩增后得到纯化率达到 95% 以上的骨髓间充质细胞。在 C 臂机下,准确找到骨折延迟愈合或不愈合部位,将骨髓间充质细胞采取多点少量的办法,缓慢注射到骨折延迟愈合或不愈合部位。每月注射一次自体骨髓间充质细胞,共注射 3 次。注射完毕后第 2 个月复查时摄 X 片观察骨折愈合情况。**结果:**69 例患者均获得随访,随访时间 2~9 个月,中位数 5.5 个月;自体骨髓间充质细胞移植 3 个月后,参照《中医病证诊断疗效标准》骨折延迟愈合或不愈合疗效评定标准评定疗效,本组治愈 65 例,好转 4 例,治愈率 94.2%。**结论:**采用自体骨髓间充质细胞移植治疗骨折延迟愈合或不愈合具有创伤小、操作简便、加速骨折愈合的特点。

[关键词] 骨折延迟愈合;骨折不愈合;骨髓间充质细胞;移植

[中图分类号] R683 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 1005-0205(2018)04-0059-03

骨折延迟愈合或不愈合是骨折术后最常见的并发症之一,目前多采用再次手术的办法治疗,但再次手术风险大、并发症多^[1]。2012 年 5 月至 2016 年 8 月,本研究采用自体骨髓间充质细胞治疗骨折延迟愈合或不愈合患者 69 例,疗效满意,现报告如下。

1 临床资料

本组 69 例:男 32 例,女 13 例;年龄 25~48 岁,中位数 38 岁。均为骨折延迟愈合或不愈合患者,其中股骨干骨折 15 例,胫骨骨折 13 例,尺桡骨骨折 12 例,尺骨下段骨折 10 例,肱骨干骨折 8 例,肱骨骨折 6 例,股骨髁上骨折 5 例,均为手术治疗后无感染性不愈合患者。69 例患者使用钢板螺钉 51 例,髓内钉 18 例,二次手术者 13 例;病程 8~13 个月,中位数 10 个月;骨折延迟愈合 33 例,不愈合 36 例。

2 方法

2.1 骨髓间充质细胞的获得、分离、培养和扩增

在生物安全柜中使用无菌技术,用针管抽取低分子量肝素钠,制备成肝素化的针管。局麻成功后,患者俯卧于手术台上,以髂后上脊为中心常规消毒皮肤,铺无菌巾。从髂后上脊处穿刺抽取约 60 mL 骨髓。采用密度梯度离心法将有核细胞从骨髓中分离出来,其中含有极少量的间充质细胞。将分离的有核细胞培养

在 DMEM+血小板裂解液(5%~20%)+强力霉素(8 μg/mL)培养液中,以后每 2~3 d 更换 1 次培养液。培养 6 d 左右在培养瓶中出现零星长梭型细胞群落,第 8 天时会出现大量细胞群落,此时使用胰蛋白酶消化细胞并计数,按照 10 000 个/cm² 的密度将细胞进行传代培养。一般情况下,从第 1 代开始,每 3 d 可进行一次细胞传代。第 2 代时骨髓间充质细胞纯化率可达到 95% 以上,可用于临床移植。将第 2 代骨髓间充质细胞按 10⁶ 个/mL 进行冷冻保存,-20℃ 冰箱过夜后,在-80℃ 冰箱中长期保存。

2.2 血小板裂解液的获取

在生物安全柜中向无菌血袋中加入低分子量肝素钠,制备成肝素化的采血袋。消毒患者皮肤后,抽取患者静脉血 400 mL。将静脉血在生物安全柜中分装进无菌离心管,在 200 g 的条件下离心 20 min,可见全血分 3 层,吸取上层血清后平均分装进 10 mL 的无菌离心管中。-20℃ 冰箱过夜后,在-80℃ 冰箱中长期保存。从-80℃ 冰箱中取出血清后在 37℃ 水浴锅中融化,时间不超过 5 min。融化后的血清在 1 700 g 的条件下离心 6 min,可见血清分为 2 层,上层为血小板裂解液,下层为少量血小板破碎后的碎片,抽取上清液后制备激活血小板裂解液。

2.3 自体骨髓间充质细胞移植

骨髓抽取完成后 1 个月左右进行自体骨髓间充质细胞移植。复苏冻存的第 2 代骨髓间充质细胞,培养

¹ 山东省文登整骨医院(山东 文登,264400)

△通信作者 E-mail: boneman@163.com

3 d 后,在生物安全柜中收集骨髓间充质细胞,用 3 mL 的血小板裂解液重悬骨髓间充质细胞。在局部麻醉成功后,常规消毒注射部位皮肤,铺无菌巾,使用一次性穿刺针大体找到骨折延迟愈合或不愈合部位。C 臂机下,准确找到骨折延迟愈合或不愈合部位,将重悬的骨髓间充质细胞采取多点少量的办法,缓慢注射到骨折延迟愈合或不愈合部位。

2.4 术后处理

术后 48 h 未发生感染者可出院。每月注射 1 次自体骨髓间充质细胞,共注射 3 次。注射完毕后第 2 个月

复查时摄 X 片观察骨折愈合情况。随访至骨折愈合,3 次注射后 8 个月仍不愈合者,随访至 12 个月结束。

3 结果

本组 69 例患者均获得随访,随访时间 2~9 个月,中位数 5.5 个月。骨折愈合 65 例,愈合时间 4~9 个月,中位数 5 个月。自体骨髓间充质细胞移植 3 个月,参照《中医病证诊断疗效标准》^[2]骨折延迟愈合或不愈合疗效评定标准评定疗效,本组治愈 65 例,好转 4 例,治愈率 94.2%。69 例患者均无不良反应发生,患者肝、肾功能均正常。典型病例 X 线片见图 1-2。



图 1 患者,女,22 岁,左股骨干骨折

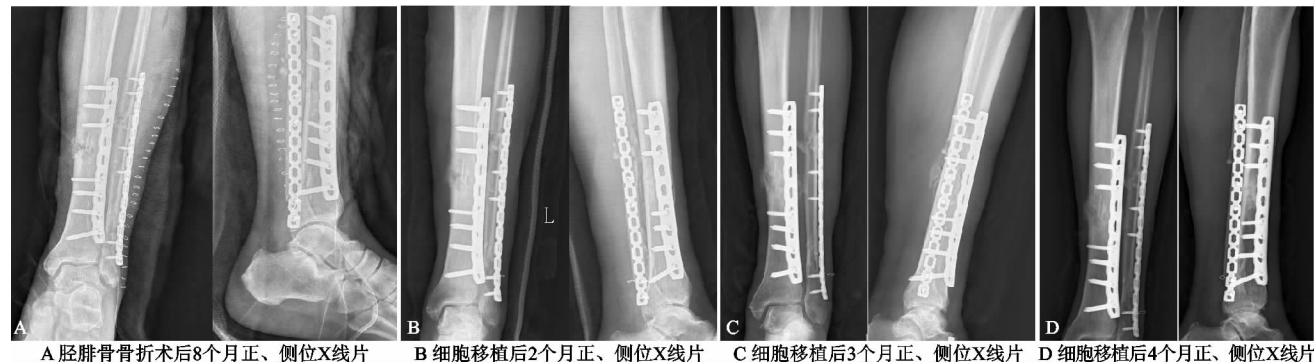


图 2 患者,男,45 岁,左胫腓骨骨折

4 讨论

骨折延迟愈合和不愈合的主要差别在于程度上的不同。一定部位和类型的骨折未能在平均时间(通常为 3~6 个月)内愈合称为延迟愈合^[3]。目前骨折延迟愈合或不愈合多采用切开植骨或内固定的二次手术治疗方法,常用的植骨材料包括自体骨、吻合血管的骨或骨膜、新鲜异体骨和冷冻干燥骨。二次手术存在固定时间长、骨来源有限、并发症多、免疫排斥等问题。此外,若采用自体骨移植,除了受区手术创伤外,供骨区域也受到手术创伤,这样就增加了患者感染的概率;若采用异体骨移植,会增加因免疫排斥而引发的感染或增加患者的心理负担和经济负担。

近年来大量研究发现,骨髓间充质细胞在特定的培养条件下可以分化为成骨细胞、软骨细胞、成纤维细胞及脂肪细胞等^[4,5],这些研究为应用自体骨髓间充质细胞治疗骨伤科疾病打下了基础。血小板裂解液中

含血管内皮生长因子(VEGF)一方面可以增加血管的恢复,这就满足了现代医学认为治疗骨折延迟愈合或不愈合的关键是促进再生血管的形成的观点,另一方面为自体骨髓间充质细胞转化为成骨细胞提供必要的条件,在与内源性 BMP 共同作用下骨髓间充质细胞转化为成骨细胞,成骨细胞在转化为纤维性骨痂,最终变成骨性骨痂,再通过塑形改造最终成为正常组织^[6]。

与其它临床治疗骨折的方法相比,自体骨髓间充质细胞移植治疗骨折延迟愈合或不愈合具有以下优点:1)注射用自体骨髓间充质细胞取材方便,来源广泛,经过 18 d 左右的实验室培养即可获得纯度在 95% 以上的自体骨髓间充质细胞;2)血小板裂解液中富含 VEGF,VEGF 可促进血管的生成,改善骨膜供血,从而缩短骨折愈合时间;3)不受骨折延迟愈合或不愈合部位软组织条件的影响;4)创伤轻,痛苦小,避免二次手术;5)采用局部麻醉的方法,在保证无菌的条件下可

在门诊治疗,从而降低了患者的医疗费用,减轻了患者的经济负担;6)不存在伦理和免疫排斥反应。生长因子和骨髓间充质细胞全部来自自体从而避免伦理问题和因排斥而引起的感染等情况的发生,但在治疗的过程中应避免因手术问题而引发的术后感染。本研究的患者均为骨不连发生后的患者,未研究首次骨折的患者,这是今后研究的方向^[3,7-11]。

综上所述,采用自体骨髓间充质细胞移植治疗骨折延迟愈合或不愈合,具有创伤小、操作简便、加速骨折愈合的特点,值得进一步深入研究和推广应用。

参考文献

- [1] Rodriguez-Merchan EC, Forriol F. Nonunion: general principle and experimental data[J]. Clin Orthop Relat Res, 2004, 419: 4-12.
- [2] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[S]. 南京: 南京大学出版社, 1994: 177-178.
- [3] 吕发明, 程国杰. 经皮自体髂骨血注射治疗长干骨骨折术后延迟愈合的临床研究[J]. 中医正骨, 2011, 23(2): 24-25.
- [4] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Sci-

ence, 1999, 284(5411): 143-147.

- [5] Prockop DJ. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Non-hematopoietic Tissues[J]. Science, 1997, 276(5309): 71-74.
- [6] 郑兴礼, 郑胜利, 郑毅. 四肢骨折不愈合与延迟愈合的治疗体会[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2006, 14(5): 33.
- [7] 高骏, 余黎媛, 金德富. 微型外固定架治疗掌指骨骨折 46 例临床报道[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(1): 59-61.
- [8] 刘立云, 刘又文, 邢庆胜, 等. InterTAN 与逆行髓内钉结合空心钉治疗股骨干合并同侧股骨颈骨折的疗效比较[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(5): 17-20.
- [9] 阎晓霞. 中药外敷结合高能体外冲击波治疗骨折延迟愈合或不愈合[J]. 中医正骨, 2012, 24(7): 56.
- [10] 任俊涛, 胡勇, 付红军, 等. 前臂吊带结合外固定架治疗锁骨中段骨折 78 例[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(10): 58-59.
- [11] 李永军, 张志辉, 潘跃然. 早期负重对胫骨骨折髓内钉术后骨愈合的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2016, 24(8): 16-18.

(收稿日期: 2017-09-03)

(上接第 58 页)

推拿后,进而配合外用痛界帖,可明显改善肩关节疼痛,增强患者功能锻炼,使患肩关节功能恢复更理想,临床疗效满意。本研究在评定患者疗效时,部分患者肩关节活动度虽未有明显恢复,但肩关节局部压痛明显消失,局部疼痛感明显改善,故笔者也将其评定为好转而不是无效。本研究使用痛界帖,每天 1 次,每天只使用 12 h,连续使用 1 周。本研究使用药物期间未发现有较严重的不良反应,仅有极个别别人忘记间断贴药,连续 1 次使用长达 36 h 后造成局部皮肤稍有发红,少许破溃,整体临床结果验证痛界帖治疗肩关节周围炎较为安全。

综上所述,痛界帖术后镇痛结合小针刀松解及手法整复、功能锻炼等综合治疗肩周炎,疗效确切,疼痛较轻,见效快,治愈率高,无后遗症,患者乐意接受,是治疗肩周炎较理想的方法。

参考文献

- [1] 李伟. 陆念祖论治肩周炎的学术经验[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2017, 25(10): 65-66.
- [2] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[M]. 南京: 南京大学出版社, 1994: 186-187.
- [3] 帅波, 杨艳萍, 沈霖, 等. 美索巴莫注射液超前镇痛在小针

刀联合推拿治疗肩周炎中的应用[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2014, 22(12): 41-42.

- [4] 姜寿山, 王力国, 孙立山, 等. 从“瘀”论治肩关节周围炎临床疗效观察[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2013, 21(2): 45-46.
- [5] 冯军平, 王承祥. 小针刀配合推拿手法治疗肩周炎的临床疗效分析[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2015, 23(2): 42-43.
- [6] 丁方平, 王人彦, 张玉柱, 等. 小针刀配合手法松解治疗膝骨关节炎的临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(4): 1275-1277.
- [7] 王钰, 赵鹏, 徐邵华. 铍针联合关节松动术治疗因“制动”所致肩周炎临床观察[J]. 北京中医药, 2003, 32(8): 608-609.
- [8] 马庆利, 王志, 陈维君, 等. 小针刀疗法治疗肩周炎 68 例分析[J]. 医学美容, 2013(1): 113-114.
- [9] Eshraghi B, Akbari MR, Fard MA, et al. The prevalence of amblyogenic factors in children with persistent congenital nasolacrimal duct obstruction[J]. Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2014, 252(11): 1847-1852.

(收稿日期: 2017-10-08)