

中药提取物 AFDR 对 IBRC 材料复合 ADMSCs 应用于兔腰椎横突间融合的影响

李晋玉¹ 徐 林¹ 金 合² 谭荣伟^{3,4} 俞 兴¹

(1 北京中医药大学东直门医院骨科中心,北京,100700; 2 北京市延庆中医院骨科,北京,102100;

3 清华大学材料学院,北京,100086; 4 深圳兰度生物材料有限公司,深圳,518057)

摘要 目的:本实验采用可注射骨修复材料(Injectable Bone Regeneration Composite,IBRC)复合脂肪间充质干细胞(Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal cells,ADMSCs)应用于兔腰椎横突间融合模型,骨碎补总黄酮(Assemble Flavone of Drynaria Rhizome,AFDR)灌胃,观察融合效果。方法:60 只成年白兔,制成兔腰椎横突间融合模型,采用安全随机法随机分为 5 组:A 组植入 IBRC 材料结合 AFDR 灌胃;B 组植入 IBRC 材料复合自体髂骨(Autologous iliac Crest Bone,ACB),结合去离子水(Deionized Water,DW)灌胃;C 组植入 IBRC 材料+ADMSCs,DW 灌胃;D 组,植入 ACB,DW 灌胃;E 组植入 ACB,AFDR 灌胃。以术后第 8 周为观察时间点,进行大体观测,手触检测,X 线片,组织学观察。结果:IBRC+ADMSCs,ACB+AFDR 组获得较好的融合率,显著高于单纯 IBRC,ACB 组($P < 0.05$),与 ACB+DW 组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:自体 ADMSCs 结合 IBRC 材料可实现与 ACB 组相似的融合率,结合中药 AFDR 灌胃,能够提高兔腰椎横突间的骨性融合率。

关键词 脂肪间充质干细胞;兔;腰椎横突间融合;可注射骨修复材料;骨碎补总黄酮

Research on the Impact of Herbal Extracts AFDR Combined with IBRC and ADMSCs used for Rabbit Lumbar Transverse Interbody Fusion

Li Jinyu¹, Xu Lin¹, Jin He², Tan Rong-wei^{3,4}, Yu Xing¹

(1 Department of Orthopedics, Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

2 Department of Orthopedics, Yanqing Chinese Medicine Hospital, Beijing 102100, China; 3 Department of Materials Science, Tsinghua University, Beijing 100086, China; 4 Shenzhen Lando Biological Material Co., Shenzhen 518057, China)

Abstract Objective: To explore the effect of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal cells (ADMSCs) which is Injectable Bone Regeneration Composite (IBRC) combined with intra-gastric administration of Assemble Flavone of Drynaria Rhizome (AFDR) on rabbits with lumbar transverse interbody fusion. **Methods:** Sixty adult rabbits were made into rabbit lumbar transverse interbody fusion models, randomly divided into five groups including A group (IBRC + AFDR), B group (IBRC + Autologous iliac Crest Bone (ACB) + Deionized Water (DW)), C group (IBRC + ADMSCs + DW), D group (ACB + DW), E group (ACB + AFDR). After eight weeks of treatment, specimens were collected for gross observation, touch detection, X-ray, histological observation. **Results:** The fusion rates of group C and group E were significantly higher than that of group B ($P < 0.05$), and there was no significantly statistical difference ($P > 0.05$) compared with the group D. **Conclusion:** IBRC composite ADMSCs can achieve a similar fusion rate as ACB group. Combining with traditional Chinese AFDR can improve the rate of the intertransverse lumbar fusion in rabbits.

Key Words Adipose-derived mesenchymal stem cells; Rabbit; Lumbar transverse interbody fusion; Injectable bone regeneration composite; Assemble flavone of drynaria rhizome

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.12.024

自体髂骨移植一直被认为是脊柱融合领域的“金标准”,但来源有限,创伤大,并伴有取骨区疼痛、神经损伤、骨折、感染等并发症。因此,急需制备理想的人工骨移植修复材料及多样治疗手段来促进脊柱融合^[1-3]。本实验采用可注射骨修复材料(Injectable Bone Regeneration Composite,IBRC)复合脂肪间充质干细胞(Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal cells,ADMSCs)应用于兔腰椎横突间融合模型,骨碎补总黄酮(Assemble Flavone of Drynaria Rhizome,AFDR)

灌胃,观察融合效果,探讨其在脊柱融合中的应用价值,为探索一种可应用于促进脊柱融合,满足临床需求的骨修复材料奠定实验基础,为脊柱融合自体骨替代材料提供新的方向,实现以中西医结合的治疗手段提高腰椎横突间植骨融合率的创新探索。现将成果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验分组 60 只新西兰白兔,体质量(2.5 ± 0.3) kg,雌雄不限,SFP 级,实验动物由北京西山实验

动物养殖厂提供, IBRC 材料(清华大学材料系馈赠), 骨碎补总黄酮(每 1 g 提取物含生药 66.67 g)(北京岐黄药业馈赠)。制成兔腰椎横突间融合模型, 采用安全随机法随机分为 5 组, 每组 12 只: A 组植入 IBRC 材料结合 AFDR 灌胃; B 组植入 IBRC 材料复合自体髂骨(Autologous iliac Crest Bone, ACB), 结合去离子水(Deionized Water, DW)灌胃; C 组植入 IBRC 材料 + ADMSCs, DW 灌胃; D 组, 植入 ACB, DW 灌胃; E 组植入 ACB, AFDR 灌胃。

1.2 给药方法 术后第 2 d, A、B、C、D、E 各组开始灌胃, AFDR 根据人兔换算公式给药, 日 1 次, 给药 8 周。DW 灌胃剂量同 AFDR 灌胃剂量。

1.3 取材时间点及数量 A、B、C、D、E 组分别在术后第 8 周各处死 12 只实验动物取材。

1.4 横突间融合方法 60 只实验白兔麻醉成功后取俯卧位(3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 耳缘静脉麻醉), 腰骶部备皮, 消毒, 常规无菌铺巾, 沿关节突外侧以 L_5 棘突为中心做长约 4 cm 纵形手术切口, 逐层切开皮肤皮下, 剥离肌肉, 显露 $L_5 - L_6$ 横突, 牙科电转打磨去皮质, 显露横突髓腔, 分别植入 IBRC 材料、复合 ADMSCs 的 IBRC 材料以及 ACB(ACB 组沿髂沿做切口, 两侧各取 18 mm × 5 mm × 3 mm 髂骨块, 以咬骨钳修剪成 14 mm × 1.5 mm × 1.5 mm 单面皮质骨条植入同侧 $L_5 - L_6$ 横突间)。术后笼养, 肌注青霉素 80 万 U/d, 连续 5 d。

1.5 观察指标

1.5.1 X 线片观察 拍摄兔后前位 X 线片, 按照 Curylo 的分级标准评分, 3、4 分诊断为坚强融合; 2 分及以下诊断为不融合。有 2 名有经验的医师用双盲法评估融合情况^[4]。

1.5.2 大体观察 处死后剔除肌肉后观察腰 5~6 横突间植骨融合情况。

1.5.3 手触检测 检查植入材料硬度, 轻柔检测腰 5~6 活动度, 无活动判定为融合, 有活动判定为不融合。

1.5.4 组织学 需行组织学观察的标本, 在手触检测、X 线摄片后立即用 10% 中性福尔马林固定 24 h, 然后脱水、包埋、切片。切片行 H. E 染色、Masson 染色和电镜观察。

1.6 数据处理运用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行统计学处理, 以 $(\bar{x} \pm s)$, 采用单因素和多因素方差分析。

2 结果

2.1 并发症 A 组: 1 只术后出现下肢瘫痪, 1 只双下肢瘫痪, 术后, 8 d、10 d 死亡, 补作 2 只。B 组: 1 只左

下肢瘫痪, 术后 72 h 后恢复。兔腰骶神经走行于髂骨近端下方, 注意保护后再未出现下肢瘫痪。感染 3 例, 均在取材时发现, 2 例为浅部轻度感染, 不影响对融合的观察。C 组: 2 只右下肢瘫痪生存至取材。D 组: 2 只术后均第 2 d 死亡, 分析为创伤大、出血多引起, 立即补作 2 只。其他实验动物均耐受麻醉、手术, 术后当天正常喂食, 不限制活动, 1 周后恢复体重。

2.2 大体观察 术后 8 周后处死, 取材进行大体观察。A 组无明显融合骨块形成, IBRC 材料零散, 有软组织包裹, 没有与植骨床融为一体, 触之脱落。B 组自体髂骨与 IBRC 材料部分区域有紧密结合, 未见表面有骨质长成。C 组 IBRC 材料与植骨床整合较好, 纤维连接和骨性连接同时存在, 各组均未出现明显的炎症反应。D、E 组在植骨床处有完整骨块形成, 与自体骨整合为一体, 靠近植骨床的部位, 移植骨和自体骨整合牢固, 触之坚硬不脱落。

2.3 X 线片观察 A 组: 标本未见骨痂生长, 仅见横突部有少许骨痂; B 组: 6 例有较少骨痂生长, 2 例有较多骨痂生长, 但不连续; 余有连续骨痂; C 组、E 组: 2 例有较多骨痂生长, 但不连续; 余有连续骨痂; D 组: 4 例有较多骨痂生长, 但不连续; 余有连续骨痂。按照 Curylo 制定客观分级标准, 评分见表 1。

表 1 Curylo 射线数据统计表

组别	射线分值					
分组(n=12)	0	1	2	3	4	3+4
A(IBRC + AFDR)	3	6	2	1	0	1
B(IBRC + ACB + DW)	2	4	3	2	1	3
C(IBRC + ADMSCs + DW)	0	1	1	5	5	10
D(ACB + DW)	0	2	2	4	4	8
E(ACB + AFDR)	0	0	2	4	6	10

注: 3、4 分诊断为坚强融合; 2 分及以下诊断为不确定融合。

2.4 手触检测 A 组没有实现任何的骨性融合; C、E 组大部分获得坚固融合; C、D、E 组未融合比率明显低于 A、B 组($P < 0.05$), 有统计学意义; ACB、C、E 组之间在坚固融合率上差异无统计学意义。D 组虽坚固融合率低于 C 组和 E 组, 但差异无统计学意义。结果见表 2。

表 2 手工检测数据统计表

分组(n=12)	坚固融合 (只)	不确定融合 (只)	假关节 (只)
A(IBRC + AFDR)	0	10	2
B(IBRC + ACB + DW)	3	4	5
C(IBRC + ADMSCs + DW)	9	2	1
D(ACB + DW)	7	3	2
E(ACB + AFDR)	9	1	2

2.5 组织学观察 A 组结果 IBRC 材料无明显降解,纤维结缔组织长入,无小梁骨长入,无炎性反应。B 组结果:在自体髂骨和 IBRC 材料结合处可见少许软骨长成,无明显小梁骨长入,材料周围长入纤维结缔组织,IBRC 材料明显降解。C 组结果:小梁骨显著长成,在小梁骨周边大量纤维结缔组织长入,在小梁骨的周边,有明显的软骨细胞聚集,IBRC 材料明显降解。D 组结果:两侧植骨床可见完整但排列紊乱的小梁骨结构,其中既有骨性连接也有纤维组织连接,无明显血管化。E 组结果:同 D 组结果,但小梁骨长入较多。

2.6 扫描电镜 术后 8 周,5 组标本均进行扫描电镜的观察,B 组支架和骨组织整合紧密,部分区域降解明显。C 组材料较多降解吸收,内部均已形成骨样组织,以纤维成骨和软骨成骨为主,其中 C、D、E 组明显优于 A、B 组。

3 结论

本研究以一种新型纳米骨可注射骨修复材料为支架,ADMSCs 作为种子细胞,中药骨碎补总黄酮灌胃进行兔脊柱融合的实验研究,本研究显示 C、D、E 组获得较好的融合率,显著高于单纯 IBRC,IBRC + ACB ($P < 0.05$);C、E 组融合率要优于 D 组,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。这个结果表明 IBRC 材料复合 ADMSCs 可以形成骨组织,并与植骨床整合良好,结合中药 AFDR 灌胃,可以提高脊柱的骨性融合率。

4 讨论

随着生命科学和材料工程等学科快速交叉发展,构建体外有生命力的组织工程化骨是修复骨缺损的热点和未来趋势^[5-6]。清华大学生物材料研究组自组装成具有天然骨分级结构和特性的海藻酸基可注射骨修复材料。它与天然骨的高相似性决定了其用于骨修复材料的优越性,是一种理想的骨修复材料^[7-8]。同时材料可添加生长因子使材料具有诱导成骨性能,并通过平衡材料使新骨成骨速度和材料降解吸收速度匹配,具有良好的生物相容性,以此为基础制备微创原位成型可注射生物材料,既可以保持仿天然骨结构的特征,又赋予了材料新的可注射性能,具有更大的应用范围,是对骨缺损治疗方法的变革,具有广阔的应用的前景^[9]。

李晋玉等^[10]发现不同浓度的骨碎补提取液对培养细胞的作用结果截然不同,高浓度对细胞有破坏作用,而中、低浓度却具有一定的促进分化作用。在体外骨细胞培养,证明 AFDR 能促进成骨细胞的活性和增殖,增加骨形成,提高骨密度,维持骨微结构的完整程度^[11-12]。

对于脊柱融合的实验,国际上并没有一个公认的检测标准。取材的时间点集中在术后 8~10 周^[13-15],本实验采用术后 8 周,处死动物,采集标本,并应用多项指标评价移植后是否发生了骨性融合。本研究表明,IBRC 材料单独植入 8 周时均未融合,组织学观察成骨效果亦不如自体骨,说明 IBRC 材料本身虽具有仿生骨的构架,但在没有复合骨诱导因子、成骨细胞的情况下,其优点仅是快速生物降解性、优良骨相容性、高效的骨传导性,其成骨效果不如 IBRC 材料 + ADMSCS 和 ACB 组。ACB + AFDR 组证明其融合效果略优于 ACB + DW 组,说明骨碎补总黄酮能够提高融合率。IBRC 材料复合 ADMSCS 应用,因含诱导成骨因子^[16-17],成骨作用明显优于单独 IBRC 材料^[18]。B 组实验结果说明 IBRC 材料与 ADMSCS 有良好的复合性,两者复合使 IBRC 材料更有利于被机体降解、利用、成骨。临床中 IBRC 材料与 ADMSCS 复合在一定情况下可替代自体骨的应用。

总之,IBRC 材料具有无免疫原性、快速生物降解性、优良骨相容性、高效的骨传导性,与 ADMSCS 有良好的复合性、成骨效率更高,便于修整以适合脊柱融合,是优良的骨替代生物材料^[19-21]。AFDR 不仅具有促进成骨作用,还有改善血循环的作用,可以促进横突间融合的速度及质量,虽然逊于材料复合 ADMSCS 的效果,但从安全、经济以及对骨质疏松的改善作用等方面考虑,仍有其进一步研究的价值。

参考文献

- [1] Perka C, Spitzer RS, Lindenhayn K, et al. Matrix - mixed culture: new methodology for chondrocyte culture and preparation of cartilage transplants[J]. Biomed Mater Res, 2000, 49(3): 305 - 311.
- [2] 俞兴, 徐林, 毕连涌, 等. 腰椎后外侧融合应用纳米晶胶原基骨材料初步效果分析[J]. 中国矫形外科杂志, 2005, 13(8): 586 - 588.
- [3] 俞兴, 徐林, 崔福斋. 纳米晶胶原基骨材料在颈椎前路中的临床应用[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2003, 1(1): 14 - 16.
- [4] Curylo LJ, Johnstone B, Petersilge CA, et al. Augmentation of spinal arthrodesis with autologous bone marrow in a rabbit posterolateral spine fusion model[J]. Spine, 1999, 24(5): 434 - 438.
- [5] Tan R, She Z, Wang M, et al. Repair of rat calvarial bone defects by controlled release of rhBMP - 2 from an injectable bone regeneration composite[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2012, 6(8): 614 - 21.
- [6] 冯庆玲, 崔福斋, 张伟. 纳米羟基磷灰石胶原骨修复材料[J]. 中国医学科学院学报, 2002, 24(2): 124 - 128.
- [7] Li DP, Shen TC, Huang YH. In vitro co - culture of nano - hydroxyapatite/collagen and mesenchymal stem cells[J]. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu, 2009, 13(25): 4973 - 4976.
- [8] Tan R, She Z, Wang M, et al. Repair of rat calvarial bone defects by controlled release of rhBMP - 2 from an injectable bone regeneration compos-

- ite[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2012, 6(8): 614–21.
- [9] 金合, 李晋玉, 俞兴, 等. 可注射骨修复材料结合骨碎补总黄酮修复极量颅骨缺损的实验研究[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2012, 9(1): 26–29.
- [10] 李晋玉, 金合, 俞兴, 等. 可注射骨修复材料结合骨碎补总黄酮修复大鼠颅骨缺损[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2013, 17(8): 2095–4344.
- [11] 谢雁鸣, 秦林林, 邓文龙, 等. 骨碎补总黄酮对成骨细胞体外培养作用的机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(3): 161–162.
- [12] 金合, 李晋玉, 俞兴, 等. 骨碎补总黄酮对颅骨缺损修复大鼠血清碱性磷酸酶、钙、磷的影响[J]. 中国骨伤, 2012, 25(9): 757–760.
- [13] Aslan H, Sheyn D, Gazit D. Genetically engineered mesenchymal stem cells: applications in spine therapy[J]. Regen Med, 2009, 4(1): 99–108.
- [14] Gan Y, Dai K, Zhang P, et al. The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion[J]. Biomaterials, 2008, 29(29): 3973–3982.
- [15] Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC. An experimental lumbar intertransverse process spinal fusion model, Radiographic, histologic, and biomechanical healing characteristics[J]. Spine, 1995, 20(4): 412–420.
- [16] Fraser J K, Wulur I, Alfonso Z, et al. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology[J]. Trends Biotechnol, 2006, 24(4): 150–154.
- [17] Schuffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells – basic and clinical implications for novel cell-based therapies[J]. Stem Cells, 2008, 25(4): 818–27.
- [18] Schimandle JH, Boden SD, Hutton WC. Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2[J]. Spine, 1995, 20(12): 1326–1337.
- [19] Caton D, Roche S. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. Exp Cell Res[J]. 2008, 314(7): 1575–1584.
- [20] Strem B M, Hicok K C, Zhu M, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells[J]. Keio J Med, 2005, 54(3): 132–41.
- [21] McIntosh KR, Lopez M J, Borneman J N, et al. Immunogenicity of allogeneic adipose derived stem cells in a rat spinal fusion model[J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(9): 2677–86.

(2013–11–12 收稿)

(上接第 1449 页)

土鳖虫、雷公藤、青风藤、老鹤草、威灵仙、鸡血藤、黄芪、穿山龙、甘草), 方具搜风通络、扶正化瘀、通络止痛功效, 还可以此为基础方辨证用汤药送服^[10], 本方遣方特点符合中医病机学理论^[11], 临床使用收效良好^[12]。

总之, 痹症是以营卫失和、脉络不通、气血凝滞、邪气壅塞为病机关键。因感受风、寒、湿、热邪之偏盛有异及体质之不同, 可形成行痹、痛痹、着痹、热痹之不同, 若痹病日久, 伤血耗气, 损及肝肾, 痰瘀交结, 寒湿凝滞, 形成正虚邪恋, 本虚标实, 虚实夹杂, 寒热错杂等顽症^[13], 病程中病机常复杂多变, 证情亦错综复杂^[14]。

以上 10 法, 既不外祛邪与扶正, 在痹症初期邪气盛体质未虚, 治以祛邪为主, 病至后期正气受损, 出现正虚邪实、虚实并见, 需祛邪扶正并重, 攻补兼施, 孰重孰轻, 贵在辨证权变^[15]。再则痹症病因非一, 患者病情有异, 所以在治法的应用上, 合则多, 分则少, 如祛风散寒除湿难以截分、通补难以截分等等, 治当综合判断细量合分比重。杨老临证时亦强调善用一方辨证加减, 以体现十法的灵活应用。

参考文献

- [1] 杨上善撰注. 黄帝内经太素[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 535–542.
- [2] 张永红, 李星星, 沙莎. 热痹的辨证论治[J]. 中医正骨, 2012, 24(4): 304–306.
- [3] 陈俊蓉, 陈立国, 王华强. 浅谈《内经》五体痹与五脏痹发病关系[J].

- 四川中医, 2012, 30(4): 44–46.
- [4] 肖振辉. 中医内科学[M]. 2 版, 北京: 人民卫生出版社, 2010: 343–351.
- [5] 肖燕, 颜学桔. 旷惠桃教授论风湿病整体观赏析[J]. 世界中医药, 2012, 7(4): 322–324.
- [6] 高尚社. 国医大师李辅仁教授治疗风湿性关节炎案赏析[J]. 中国中医药现代远程教育, 2012, 10(15): 9–12.
- [7] 王勇, 章敏, 赵映前. 热痹浅析[J]. 中医药管理杂志, 2007, 15(2): 949–951.
- [8] 朱良春. 益肾壮督治其本, 虫蚁搜剔治其标[J]. 江苏中医药, 2008, 40(1): 2–3.
- [9] 高想, 朱良春. 虫类药的应用历史与展望[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(6): 807–809.
- [10] 林为民, 郭立中. 杨宗善主任医师治疗类风湿关节炎经验[J]. 南京中医药大学学报, 2006, 22(3): 138.
- [11] 郭齐, 李献平, 王蕊, 等. 中医治疗类风湿关节炎的药物探讨[J]. 世界中医药, 2010, 5(2): 136–137.
- [12] 林为民, 杨宗善, 郭立中. 类风湿康胶囊为主治疗类风湿性关节炎 116 例[J]. 陕西中医, 2006, 27(12): 1509–1510.
- [13] 陈岩, 周学平. 类风湿关节炎病理理论研究进展[J]. 山东中医药大学学报, 2012, 36(1): 78–80.
- [14] 方樑, 周学平, 李国春, 等. 类风湿关节炎 83 例病机演变规律研究[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(7): 7–9.
- [15] 林为民, 石鹏, 付宇, 等. 中西医结合治疗强直性脊柱炎[J]. 世界中医药, 2012, 7(6): 508–509.

(2013–03–26 收稿)