

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.14.004

文章编号: 1005-8982(2017)14-0019-05

Bcl-2 基因转染骨髓干细胞治疗 激素性股骨头坏死的疗效研究*

张立岩¹, 孙新², 田丹², 罗勇³, 陈继营⁴, 柴伟⁴, 王华¹, 徐睿¹, 刘鑫¹, 王海涛¹

(1. 北华大学附属医院 骨外 1 科, 吉林 吉林 132001; 2. 北华大学生命科学研究中心, 吉林 吉林 132001;
3. 中国矿业大学材料学院, 江苏 徐州 221116; 4. 解放军总医院, 北京 100853)

摘要:目的 研究 Bcl-2 基因转染的骨髓间充质干细胞(BMSCs)结合髓芯减压法对兔早期激素性股骨头坏死的疗效。**方法** 使用共计 40 只家兔复制早期激素性股骨头坏死模型, 其中成功的模型家兔共 28 只。随机分为 4 组: 空白对照组 6 只, 不作任何处理; 髓芯减压组 6 只, 单纯减压; BMSCs 治疗组 8 只, 在减压同时植入 BMSCs; Bcl-2 治疗组 8 只, 在减压同时植入 Bcl-2 基因转染的 BMSCs。植入后分别在第 8、12 周各取股骨头标本行病理学检查及骨细胞凋亡检测, 观察骨细胞生长及凋亡情况。**结果** 成功复制兔早期激素性股骨头坏死动物模型; 培养出 BMSCs 后进行传代; Bcl-2 基因转染成功; 治疗 12 周后, Bcl-2 治疗组动物的一般情况改善, 组织切片和细胞凋亡检测结果显示, Bcl-2 治疗组的空骨陷窝和骨细胞凋亡数量与其他 3 组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 使用髓芯减压将 Bcl-2 基因修饰的 BMSCs 移植到兔早期激素性股骨头坏死动物模型体内, 具有较好的成骨治疗作用。

关键词: 骨髓间充质干细胞; Bcl-2 基因; 股骨头坏死; 髓芯减压

中图分类号: R684

文献标识码: A

Treatment of steroid-induced femoral head necrosis with Bcl-2 gene modified bone marrow mesenchymal stem cells*

Li-yan Zhang¹, Xin Sun², Dan Tian², Yong Luo³, Ji-ying Chen⁴, Wei Chai⁴,
Hua Wang¹, Rui Xu¹, Xin Liu¹, Hai-tao Wang¹

(1. The First Department of Orthopaedics, the Affiliated Hospital of Beihua University, Jilin, Jilin 132001, China; 2. Life Science Research Center, Beihua University, Jilin, Jilin 132001, China; 3. School of Materials Science and Engineering, China University of Mining and Technology, Xuzhou, Jiangsu 221116, China; 4. Department of Orthopedics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

Abstract: Objective To explore the curative effect of implantation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transfected with Bcl-2 combined with core decompression on experimental femoral head necrosis in rabbits. **Methods** Forty rabbits were selected, and femoral head necrosis models were successfully prepared in 28 rabbits. Then, the model rabbits were randomized into 4 groups: blank control group ($n = 6$) without treatment, core decompression group ($n = 6$), BMSCs group ($n = 8$) subjected to core decompression and implantation of BMSCs, and Bcl-2 group ($n = 8$) subjected to core decompression and implantation of Bcl-2-transfected BMSCs. In the 8th and 12th week after implantation, femoral head tissues were taken and sliced into sections for pathological examination and detection of osteocyte apoptosis. **Results** Bcl-2 gene was successfully trans-

收稿日期: 2017-01-12

* 基金项目: 吉林省科技发展计划 (No: 20150312013ZG); 吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目 [No: 吉教科合字 (2015) 第 141 号]; 吉林省教育厅“十三五”科学技术研究项目 [No: 吉教科合字 (2016) 第 63 号]

[通信作者] 孙新. E-mail: sunxinbh@126.com

ected into BMSCs. At the 8th week after implantation, there was only a little new bone formation in the core decompression group and the BMSCs group; at the 12th week, fibrous tissues were formed in the decompression channel. In the Bcl-2 group, new bone formation was observed, and at the 12th weeks, the necrotic region was completely repaired. The positive TUNEL staining of the Bcl-2 group was much less than that of the other groups, the differences were significant ($P < 0.05$). **Conclusions** These findings indicate that Bcl-2-transfected bone marrow mesenchymal stem cell transplantation via core decompression has better curative effect on experimental femoral head necrosis in rabbit model.

Keywords: bone marrow mesenchymal stem cell; Bcl-2 gene; femoral head necrosis; core decompression

激素性股骨头坏死(steroid-induced necrosis of femoral head, SANFH) 发病率在非创伤性股骨头坏死中排首位, 并且发病率最近几年越来越高^[1]。SANFH 的发病机制涉及的假说包括脂肪代谢紊乱、骨细胞凋亡、血管内凝血、骨内高压及骨细胞毒素作用等, 其中任何一种都不能完整阐述 SANFH 的发病机制, 给临床预防和治疗工作带来巨大影响^[2]。近年来, 细胞凋亡与骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 和 SANFH 之间的联系逐渐被发现, 为研究 SANFH 找到新的方向。国外学者 REED^[3]的研究表明, Bcl-2 基因有较强的抗凋亡能力, 髓芯减压对于改善 SANFH 坏死部位的微环境有重要作用。因此, 本研究拟使用转染 Bcl-2 基因的 BMSCs 联合髓芯减压的方法治疗兔早期 SANFH, 并评价其治疗效果。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 成年雄性 25 ~ 30 周龄家兔共 40 只用于复制模型, SPF 级, 体重为 (3.0 ± 0.2) kg; 另外准备 1.5 个月龄雄性家兔共 8 只用于原代 BMSCs 提取与培养, 体重均 < 2.0 kg, 所有动物由北华大学动物实验室提供。

1.1.2 主要实验设备与仪器 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司), 超净工作台(上海力申科学仪器有限公司), 二氧化碳 CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo 公司), 低速离心机(上海安亭科学仪器厂), 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司), 不锈钢细胞筛网(上海易佰聚经贸有限公司), 培养瓶、细胞培养皿及离心管(美国 Corning 公司), 石蜡切片机(德国莱卡公司)。

1.1.3 主要试剂 胎牛血清(美国 HyClone 公司); 改良伊格尔培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养液(美国 Hyclone 公司); II 型胶原酶(美国 Sigma 公司); 0.20% 乙二胺四乙酸、0.25% 胰

蛋白酶(美国 Gibco 公司); lipofectamin™ 2000(美国 Invitrogen 公司); TUNEL 试剂盒(美国罗氏公司)。

1.2 方法

1.2.1 兔早期 SANFH 模型的复制 在兔两侧臀肌交替注射地塞米松磷酸钠(10 mg/kg), 3 d/次, 为预防感染, 每周 1 次臀肌注射青霉素(5 万 u/kg)。由于操作不当等原因在模型制备过程中共有 4 只兔死亡。8 周后将剩余 36 只兔经过核磁共振筛选, 共发现 28 只兔发生 SANFH。

1.2.2 BMSCs 的原代培养、传代 使用 20% 乌拉坦(4 ml/kg) 经兔耳缘静脉注射麻醉, 在无菌台仰卧位固定, 去除手术区的毛发, 常规消毒、铺巾, 沿髂前上棘向下方向切一长度约 6.0 cm 的切口, 暴露股骨干骨髓腔, 使用不含血清的 DMEM 培养液反复冲洗骨髓腔, 用 200 目不锈钢细胞筛网过滤, 将过滤后液体移至 Ep 管。吹打均匀后调整浓度为 1×10^6 个/ml, 并接种于 25 cm² 培养瓶中, 于 37℃、5% CO₂ 的饱和湿度条件的培养箱中进行培养。按照 1:2 或 1:3 的比例传代, 倒置相差显微镜下观察细胞形态特征以及生长情况。细胞扩增后, 取 P2 ~ 3 代用于相关实验。

1.2.3 Bcl-2 基因转染 将传代后的 BMSCs 消化为细胞悬液, 通过形态学观察与流式细胞仪表面抗原鉴定。转染前 24 h 将处于对数生长期的细胞用胰酶消化后重新接种 25 cm² 培养瓶中, 继续培养 24 h。细胞达到 80% ~ 90% 密度时开始转染。使用脂质体将外源性 Bcl-2 基因导入到真核细胞中(按 Lipofectamine™ 2000 脂质体说明书进行操作)。Western blot 检测鉴定。

1.2.4 髓芯减压后植入 将 SANFH 模型成功的 28 只家兔按照随机原则分为 4 组: 空白对照组 6 只、髓芯减压组(CD 组)6 只、BMSCs 联合髓芯减压治疗组(BMSCs 治疗组)8 只及 Bcl-2 转染 BMSCs 联合髓芯减压治疗组(Bcl-2 治疗组)8 只。麻醉方法同上, X 线透视下, 在股骨头中钻入 2.0 mm 克氏针, 达股

骨头关节软骨下约 1.5 mm。分别将 *Bcl-2* 基因转染的 BMSCs(约 1.0×10^6 个)和等量的 BMSCs 与明胶海绵复合,分别植入 *Bcl-2* 治疗组和 BMSCs 治疗组的双侧股骨头,髓芯减压钻孔用骨蜡封闭。髓芯减压组单纯行坏死病灶区域钻孔减压。空白对照组未做任何处理。

1.2.5 组织学观察 植入后分别于第 8、12 周在各组随机取 3 只家兔,*Bcl-2* 治疗组和 BMSCs 治疗组沿植入明胶海绵的纵轴方向切开股骨头标本,苏木精-伊红染色后在光镜下观察骨的生长情况。并对植入后 12 周标本进行骨形态计量学测定,统计空骨陷窝数量,计算空骨陷窝百分比。

1.2.6 细胞凋亡检测 沿冠状面纵行剖开相应的股骨头标本,常规制备 SP 免疫组织化学石蜡切片,采用 TUNEL 凋亡检测试剂盒进行检测。结果观察: TUNEL 染色后细胞核内棕褐或黄色为阳性细胞;否则视为假阳性着色。统计凋亡细胞比率(凋亡细胞/所有细胞总数)。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 *t* 检验,多组间比较用方差分析,若差异有统计学意义,用 SNK-*q* 检验做两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

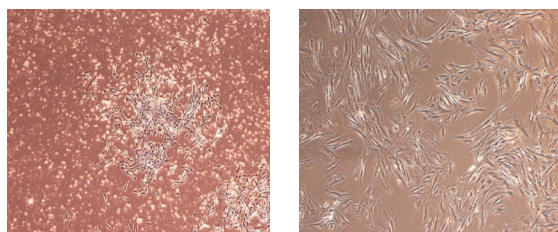
2 结果

2.1 BMSCs 细胞形态

细胞培养 10 d 后,可见细胞形态呈梭形等不规则形状,局部形成克隆群落,形态为放射状或旋涡状,2 周后细胞接近铺满瓶底,此时为原代细胞。第 3 代细胞形态为均匀的梭型,排列为旋涡状。见图 1。

2.2 兔 BMSCs 转染结果

Bcl-2 基因转染成功,携带绿色荧光蛋白。Western blot 检测被转染细胞 *Bcl-2* 的表达,转染组 *Bcl-2* 的相对光密度值为(0.811 ± 0.017),空白对照组的相对光密度值为(0.116 ± 0.008),经 *t* 检验,差



细胞培养第 10 天 P3 代
图 1 BMSCs 细胞 (× 100)

异有统计学意义 ($t = 152.396, P = 0.000$), 转染组 *Bcl-2* 表达为空白组的 6.976 倍。重组质粒酶切鉴定。见图 2~4。

2.3 一般情况

注射药物 8 周后,28 只兔表现跑动减少、跛行。分组治疗 12 周后,*Bcl-2* 治疗组动物跑动增加,步态正常;BMSCs 治疗组、髓芯减压组动物跑动增加,跛行程度减轻;空白对照组无变化。

2.4 组织学观察结果

建模成功后组织病理学检测符合 SANFH 的早

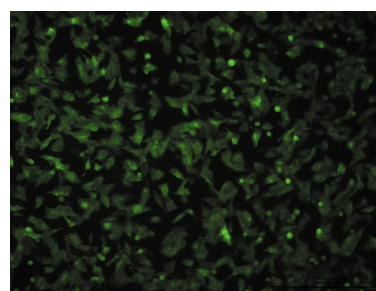


图 2 *Bcl-2* 成功转染 BMSCs 后携带绿色荧光 (× 100)

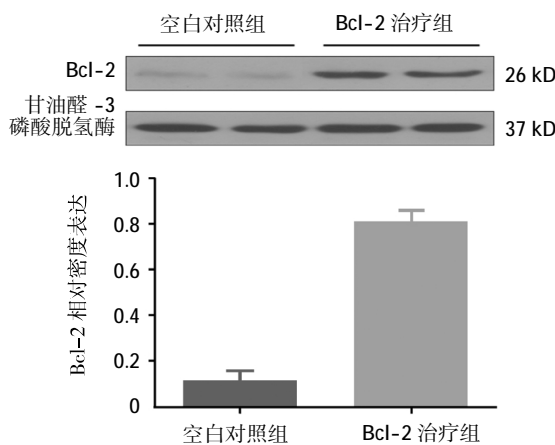


图 3 BMSCs 转染成功后 *Bcl-2* 表达

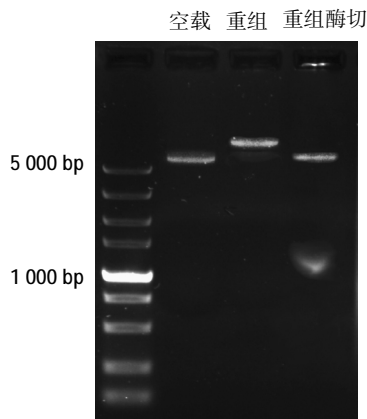
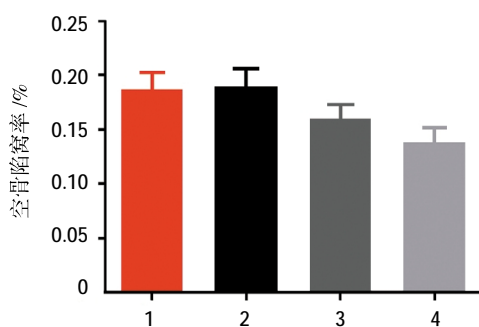


图 4 重组质粒酶切结果

期表现。治疗 8 周后, Bcl-2 治疗组的骨细胞坏死碎片减少, 活性骨髓细胞较其他 3 组增多; BMSCs 治疗组股骨头结构紊乱, 骨小梁变细、断裂; 髓芯减压组与空白对照组空骨陷窝及脂肪细胞数量较其他两组增多, 活性细胞数量减少。治疗 12 周后, Bcl-2 治疗组骨髓组织结构紊乱, 但较其他两组改善, 空骨陷窝数量减少, 骨小梁较前增粗, 少见断裂; BMSCs 治疗组股骨头骨髓组织结构仍紊乱, 坏死碎片聚集程度比髓芯减压组、空白对照组减少。应用 Image Pro Plus 6.0 软件检测阳性细胞所占百分比分别为: $(18.62 \pm 1.66)\%$ 、 $(18.93 \pm 1.71)\%$ 、 $(15.96 \pm 1.16)\%$ 和 $(13.80 \pm 1.28)\%$, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=50.182, P=0.001$)。Bcl-2 治疗组空骨陷窝率与空白对照组、髓芯减压组及 BMSCs 治疗组进行两两比较, 差异有统计学意义 ($P=0.000$); BMSCs 治疗组与髓芯减压组、空白对照组两两比较, 差异有统计学意义 ($P=0.000$); 髓芯减压组与空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P=0.585$)。见图 5。

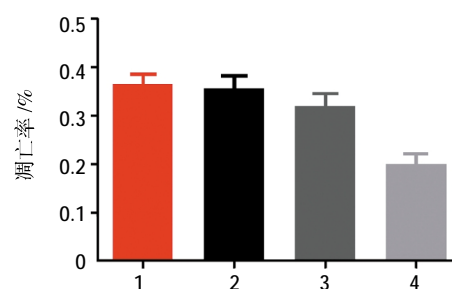
2.5 细胞凋亡情况

TUNEL 染色显示, 空白对照组、髓芯减压组和 BMSCs 治疗组阳性细胞数最多, 表明发生凋亡情况最严重; Bcl-2 治疗组细胞凋亡数减少, 表明细胞凋亡被抑制。应用 Image Pro Plus 6.0 软件检测阳性细胞数的百分比分别为 $(36.46 \pm 1.67)\%$ 、 $(35.64 \pm 2.54)\%$ 、 $(31.94 \pm 1.94)\%$ 和 $(19.95 \pm 1.37)\%$, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=280.064, P=0.001$)。Bcl-2 治疗组细胞凋亡比率与空白对照组、髓芯减压组、BMSCs 治疗组进行两两比较, 差异有统计学意义 ($P=0.000$); BMSCs 治疗组凋亡比率与髓芯减压组、空白对照组进行两两比较, 差异无统计学意义 ($P=0.000$); 髓芯减压组与空白对照组凋亡比率比较, 差异无统计学意义 ($P=0.260$)。见图 6。



1: 空白对照组; 2: 髓芯减压组; 3: BMSCs 治疗组; 4: Bcl-2 治疗组

图 5 每组空骨陷窝比率 ($\bar{x} \pm s$)



1: 空白对照组; 2: 髓芯减压组; 3: BMSCs 治疗组; 4: Bcl-2 治疗组

图 6 各组凋亡比率 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

随着生活方式的改变以及糖皮质激素广泛使用, 作为其严重并发症之一的 SANFH 发病率逐年增高, 且绝大多数患者为青壮年。由于其发病机制至今尚未完全阐明; 因此, 临床上无有效的治疗方法, 保守治疗无效的 SANFH 多采用手术治疗, 早期患者多使用髓芯减压法治疗, 但效果不理想; 晚期患者只能采用人工髋关节置换术, 但髋关节置换假体费用昂贵、创伤大, 可能合并有较多并发症^[4-5]。因此 SANFH 应重点在发病机制及早期病变治疗上的研究。

关于 SANFH 的发病机制, 有研究人员认为, 与 BMSCs 相关, 股骨头坏死内的微环境在激素的作用下改变 BMSCs 的分化和增殖能力, 使得股骨头坏死病灶内的 BMSCs 脂肪化, 并导致成骨分化降低^[6-7]。近年来, 将调控 BMSCs 定向分化为成骨细胞的基因转染技术应用在治疗 SANFH 方面取得巨大的进步^[8]。张雁儒等^[9]研究表明, 转染 BMP-2 的 BMSCs 可诱导成骨细胞, 治疗 SANFH 可以取得较为理想的效果。HAN 等^[10]研究显示, 过表达 P-gp 可以抑制 BMSCs 脂肪化并促进骨生成, 从而减少激素诱导的股骨头坏死的发生率。但是 BMSCs 在体内存在快速凋亡、稀释、降解及细胞数量不足等问题, BMSCs 在体外分离培养扩增过程中同样会导致分泌细胞因子及合成表面的受体能力下降, 使其自身失去趋化、支持及营养等功能, 细胞干性消失。为解决该问题, 笔者寻找一种可以减少 BMSCs 的凋亡, 同时能够对 SANFH 有治疗作用的基因。Bcl-2 基因最早由 TSUJIMOTO 等于 1985 年发现, 是研究最早, 也是被认为在凋亡这一过程中最重要的基因。Bcl-2 是通过调控线粒体外膜的功能来实现对凋亡的调控^[11]。Bcl-2 基因的主要生理功能为抑制细胞凋亡, 并增加细胞的存活时间, 但同时不对细胞周期和分化能力产生影响。VAUX 等^[12]

研究表明,过表达 *Bcl-2* 基因可以维持细胞的存活,同时对细胞的增殖无影响。凋亡该过程也与股骨头坏死密切相关,笔者前期研究证实早期 SANFH 是由于骨细胞坏死与凋亡的协同作用,大剂量激素可降低 *Bcl-2* 蛋白质水平转录,从而使 p53 蛋白的表达提高,*Bcl-2* 与 p53 共同对骨细胞的凋亡进行控制^[12]。张锐东等^[13]研究发现,激素可提高 Caspase-3 的表达从而加速骨细胞凋亡,同时抑制 *Bcl-2* 的表达,对抗凋亡起抑制作用,从而导致 SANFH 的发生。因此,本研究将 *Bcl-2* 作为 BMSCs 抗凋亡协同基因来进行早期的 SANFH 的治疗。

BMSCs 的治疗包含多种移植路径。最常用的静脉内注射方法虽然存在简单易行等优点,但是其所需细胞量更大。目前认为,在对患者进行髓芯减压后,通过减压孔移植 BMSCs,可以通过局部的内环境为 BMSCs 的移植创造更好的生长环境^[14]。本实验复制兔早期 SANFH 模型,并在 X 线透视下,向股骨头内钻入直径 2.0 mm 克氏针,将移植物与明胶海绵材料复合,植入股骨头坏死病灶内,通过实验证实可以有效表达 *Bcl-2* 目的基因,从而起到拮抗凋亡作用和促进成骨,最终起到对坏死病灶的修复,达到治疗早期 SANFH 目的。

本实验通过培养 BMSCs 并进行传代,将携带 *Bcl-2* 的脂质体成功地转染到兔 BMSCs 中,并顺利表达目的蛋白,证明该技术的可操作性。治疗 8 和 12 周后分别对 4 组行组织学观察和细胞凋亡检测,*Bcl-2* 转染 BMSCs 联合髓芯减压组在一般状态观察、空骨陷窝比率及骨细胞凋亡等方面较其他 3 组改善。证明 BMSCs 与 *Bcl-2* 相结合并联合髓芯减压比单纯的 BMSCs 移植以及髓芯减压的治疗效果更为良好。转染 *Bcl-2* 的 BMSCs 新骨形成加速,并且对抗骨细胞凋亡更为有效,在短时间内完成坏死病灶的修复,对局部的骨坏死达到有效的治疗作用。本研究结果对临床中使用基因治疗股骨头坏死具有一定的参考价值,为今后治疗早期 SANFH 提供一种新的思路与方法,并在基因水平治疗 SANFH 打下基础。

本实验仅在动物实验中初步探讨 BMSCs 作为 *Bcl-2* 基因载体治疗 SANFH 的可能,其他因素诸如 BMSCs 作为基因治疗载体的作用、基因治疗的长期效果如何、有无副作用等还需今后深入研究。

参 考 文 献:

- [1] 蒋玮. 股骨头坏死保头治疗研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19(1): 100-104.
- [2] 王傲. 激素性股骨头坏死发病机制的研究进展[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2016, 31(4): 445-446.
- [3] REED J C. *Bcl-2* and the regulation of programmed cell death[J]. *Journal of Cell Biology*, 1994, 124(1-2): 1-6.
- [4] HELBIG L, SIMANK H G, KROEBER M, et al. Core decompression combined with implantation of a demineralised bone matrix for non-traumatic osteonecrosis of the femoral head[J]. *Archives of Orthopaedic & Trauma Surgery*, 2012, 132(8): 1095-1103.
- [5] JUNNILA M, SEPPÄNEN M, MOKKA J, et al. Adverse reaction to metal debris after Birmingham hip resurfacing arthroplasty[J]. *Acta Orthopaedica*, 2015, 86(3): 1-6.
- [6] HERNIGOU P, BEAUJEAN F, LAMBOTTE J C. Decrease in the mesenchymal stem-cell pool in the proximal femur in corticosteroid-induced osteonecrosis[J]. *Journal of Bone & Joint Surgery British Volume*, 1999, 81(2): 349-355.
- [7] WANG G J, CUI Q, BALIAN G. The Nicolas Andry award. The pathogenesis and prevention of steroid-induced osteonecrosis[J]. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 2000, (370): 295-310.
- [8] LAU R L, PERRUCCIO A V, EVANS H M, et al. Stem cell therapy for the treatment of early stage avascular necrosis of the femoral head: a systematic review[J]. *Bmc Musculoskeletal Disorders*, 2014, 15(1): 156.
- [9] 张雁儒, 马辉, 张辉, 等. BMP-2 转染 BMSCs 修复兔股骨头坏死模型的实验研究[J]. 中国临床解剖学杂志, 2013, 31(4): 447-452.
- [10] HAN N, LI Z, CAI Z, et al. P-glycoprotein overexpression in bone marrow-derived multipotent stromal cells decreases the risk of steroid-induced osteonecrosis in the femoral head[J]. *Journal of Cellular & Molecular Medicine*, 2016, 20 (11): 2173-2182.
- [11] VAUX D L, CORY S, ADAMS J M, et al. *Bcl-2* gene promotes hematopoietic-cell survival and cooperates with C-Myc to immortalize Pre-B-cells[J]. *Nature*, 1988, 335(6189): 440-442.
- [12] 张立岩, 马恩元, 祖德玉, 等. 早期激素性股骨头坏死骨细胞凋亡与 *Bcl-2* 和 p53 表达的实验研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(13): 1945-1947.
- [13] 张锐东, 张澜, 毛洪刚, 等. 激素性股骨头坏死模型中凋亡相关因子的表达[J]. 中国组织工程研究, 2013(7): 1189-1195.
- [14] TABATABAEE R M, SABERI S, PARVIZI J, et al. Combining concentrated autologous bone marrow stem cells injection with core decompression improves outcome for patients with early-stage osteonecrosis of the femoral head: a comparative study[J]. *Journal of Arthroplasty*, 2015, 30(9 Suppl): 11-15.

(李科 编辑)