

·综述·

关节腔内注射细胞制剂治疗骨关节炎的临床研究进展

张文博 赵东宝

【摘要】 关节腔内注射细胞制剂是治疗骨关节炎(OA)的新趋势,且展现了良好的临床效果、安全性及可行性。细胞制剂有多种类型,包括血小板、干细胞和单个核细胞(MNCs)。血小板制剂倾向于基层医疗机构应用和早期OA患者的治疗;MNCs较适用于不具备干细胞培养条件的医疗机构和中期OA患者应用;而干细胞制剂较适合高级别医疗机构和晚期OA患者应用。虽然腔内注射细胞产品治疗OA进行了大量临床研究,但亦有不足;因此制定腔内注射治疗OA不同细胞制剂的质量控制标准、临床应用标准和进行大样本多中心随机对照临床试验势在必行。探索外泌体、外周血MNCs治疗OA的临床研究及其分子机制,是研究的新切入点。

【关键词】 骨关节炎; 腔内注射; 血小板; 单个核细胞; 干细胞

Overview of cellular agents injection into intracavity therapy for osteoarthritis in clinical research Zhang Wenbo, Zhao Dongbao. Department of Rheumatology and Immunology, Changhai Hospital, Naval Military Medical University, Shanghai 200433, China
Corresponding author: Zhao Dongbao, Email: dongbaozhao@163.com

【Abstract】 In recent years, intra-articular injection of cellular agents is a new trend in the treatment of osteoarthritis (OA) and clinical studies also showed it has good effectiveness, safety and feasibility. Cell agents including platelets, stem cells and mononuclear cells (MNCs) and they are mainly applied in the injection with their own advantages and disadvantages. Platelet agents are mainly used for primary medical institutions and early OA patients. MNCs are suitable for mid-term OA patients and medical institutions where stem cells cannot be cultured. By contrast, stem cells may be suitable for high-level medical institutions and patients with advanced OA. Although a large number of clinical studies have been carried out on intracavity injection of cellular agents in the treatment of OA, there are still found many problems. It is necessary to establish the quality control standard, clinical application standard and large sample multicenter for randomized controlled clinical trial of cellular agents for the treatment. In the next step, we should further study the therapeutic mechanism and the clinical application of exosomes and peripheral blood MNCs in the treatment of OA.

【Key words】 Osteoarthritis; Intracavity injection; Platelet; Mononuclear cells; Stem cells

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种常见病和多发病,严重影响生活质量且致残率高^[1]。目前临床采用的理疗、抗炎药物、止痛药、糖皮质激素、医用几丁糖、医用臭氧、透明质酸、关节镜清理术及截骨术等对症治疗,不能促进软骨修复及延缓病程的进展。细胞制剂腔内注射,是目前治疗OA的前沿与热点,临床研究发现,细胞制剂具有较好的抗炎、止痛、修复软骨损伤、促进软骨再生、改善关节功能和延缓病程进展的功能,且不良反应少,是治疗OA的新趋势。但细胞制剂有多种类型,各有其优缺点,为探讨适宜的细胞治疗方法,本文对不同细胞制剂治疗OA的有效性、安全性、可行性及发展趋势等进行综述。

1 关节腔内注射血小板及其衍生产品治疗OA

血小板是成熟骨髓巨核细胞胞浆脱落的小块胞质,有

质膜,没有细胞核,是最小的血细胞。目前临床用于治疗OA的制剂主要有富血小板血浆(platelet-rich-plasma, PRP)和血小板裂解液(platelet lysate, PL)。PRP名词的出现,最早见于1957年^[2]。PRP根据白细胞含量分为富白细胞富血小板血浆(leukocytes-rich platelet-rich plasma, L-PRP)和纯富血小板血浆(pure platelet-rich plasma, P-PRP)或称为去白细胞PRP和低浓度白细胞PRP等^[3-5]。PL又称为PRP裂解液(platelet-rich plasma lysate, PRP-L),是浓缩血小板进一步裂解后所获得的液体成分,含有多种血小板源性细胞因子。

1.1 血小板及其衍生产品的制备

制备PRP的方法较多,常用的制备方法主要有设备自动化和手工制备。设备自动化PRP制备,早期应用自体血液回收机,现主要应用血液成分分离机,如NGLXCF 3000、一次性使用单采血液分离器P-2000等。虽然中国输血协会临床输血管理专业委员会《自体富血小板血浆制备技术专家共识》推荐自动化制备PRP的方法,但由于设备较为昂贵,患者可接受度低,目前PRP治疗OA,临床仍然多采用手工制备的方法。手工制备PRP,利用血液中各组分的沉降

系数差异,通过离心的方法,将血小板与红、白细胞分开,实验证明,二次离心法可以制备出符合临床要求的 PRP^[6],常用的有 Aghaloo 法、Landesberg 法和 Peturgaro 法, PRP 制备套装的应用,提高了制备的方便程度和标准化,目前我国上市的 PRP 制备套装,主要有山东鑫昊源、山东威高和云南步帆等品牌。PRP 中血小板的浓度,是治疗 OA 效果的重要因素,血小板浓度大于 $1\,000 \times 10^9/L$ 、正常血液血小板含量的 3~5 倍,是比较公认的浓度。自体、同种异体纯化 PRP 均能在一定程度上改善膝骨关节炎软骨细胞的增殖能力,促进软骨细胞修复,但自体 PRP 的治疗效果更为明显^[7]。对于 PRP 制备是否保留白细胞或激活血小板问题,存在争议,目前临床多用 L-PRP 治疗 OA; 但应用前是否激活血小板治疗 OA 的差异,尚未见报道。另外, PRP 中红细胞残留量的问题,亦应引起重视,有研究证明, PRP 中含有的红细胞,会崩解、溶血和促进炎症,影响 OA 的治疗效果^[8]。

PL 的制备以 PRP 或浓缩血小板为原料,通过反复冻融或超声处理进行。超声处理制备 PL,利用超声波细胞粉碎仪,多次超声波粉碎血小板处理,离心去除血小板碎片,获得 PL,有实验证明,超声处理制备的 PL 含有细胞生长因子的量更高^[9]。但目前临床 PL 治疗 OA,仅见利用 PRP 反复冻融法制备 PL 的报道。反复冻融法制备 PL,采用 -80°C 和 -37°C 不同温度冻融的方法均有报道,反复冻融 3~6 次。对于 PL 制备前是否利用凝血酶和钙离子等激活血小板的问题,刘广亚等^[10] 研究发现,是否激活血小板,对获得的 PL 中生长因子含量差异均无统计学意义,不建议血小板激活。并于 2017 年建立了以浓缩血小板反复冻融制备血小板裂解液的有效方法并初步确立了其质量标准^[10]。

1.2 关节腔内注射 PRP 治疗 OA 的临床研究

PRP 含有血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、类胰岛素生长因子 (insulin-like growth factor, IGF)、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 等细胞因子^[11]。体内外研究证实, PRP 通过润滑关节、降低摩擦系数和减少关节软骨磨损,抑制炎症反应和减轻疼痛,促进细胞外基质的分泌、软骨细胞的增殖和滑膜细胞分泌透明质酸等机制,减轻关节炎症反应和促进软骨愈合,从而减轻 OA 症状和改善关节功能^[12-13]。

2010 年 Sampson 等^[14] 首次证明关节腔内注射 PRP 可降低 OA 患者疼痛和改善关节功能以来,临床进行了大量 PRP 治疗 OA 的研究。结果发现,关节腔内注射 P-PRP 治疗 OA,可以有效降低关节疼痛、改善临床症状和提高关节活动功能,降低外周血疼痛介质感觉神经肽 P 物质、5-羟色胺、前列腺素 E2、炎症因子白介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α 等的水平,效果优于玻璃酸钠,除 50% 患者出现关节皮肤温度升高外,其余无局部红肿和感染等不良反应发生^[15]; 与关节腔内注射玻璃酸钠比较,注射 L-PRP 治疗 OA,在缓解疼痛、降低关节僵硬、改善日常活动难度、减轻躯体疼痛、对日常生活影响度和提高身体一般健康状况等方面具有优势^[16]; 与 L-PRP 比较, P-PRP 治疗 OA 效果更好^[17]。近年来众多 Meta 分析亦证明,关节腔内注射 PRP 治疗 OA 具有止痛、改善关节症状

和提高关节功能的作用,效果优于生理盐水、透明质酸、臭氧和皮质类固醇等,不良反应较少,是一种治疗 OA,特别是早期 OA,疗效确切的治疗方法^[18-21],但是亦有研究发现, PRP 可能不会导致透明软骨再生和改善疾病的进程,且随着时间的推移,临床获益有限,缓解期不到 1 年^[22-23]。

1.3 关节腔内注射 PL 治疗 OA 的临床研究

PL 含有血小板源性的 PDGF、TGF- β 、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)、EGF、VEGF、IGF、结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 和基质细胞衍生因子 (stroma derived factor, SDF) 等细胞生长因子^[9,24-25]。PL 早期主要用于干细胞培养,促进细胞的增殖,2015 年 AI-Ajlouni 等^[24] 首先用于治疗 OA。近年来,国外 PL 治疗 OA 的研究较少,国内进行了较多的研究。临床研究证明,关节腔内注射 PL,可以有效减轻关节疼痛、增加运动功能、改善症状和提高生活质量,效果优于玻尿酸钠,无明显不良反应^[26-27]; PL 与倍他米松、硫酸软骨素联合应用或体外人工膝支具辅助应用,效果更好^[28],可以达到 PRP 相似的结果^[29],且一次抽取外周血可以制备多份 PL 保存应用,避免了 PRP 治疗每次需抽取外周血制备的弊端,可以门诊治疗,患者依从性较好^[24]。

血小板制剂治疗 OA 的效果优于临床关节内注射传统应用药物的方法,不良反应较少、制备简单和所需设备少,是基层医疗机构易于开展的医疗技术,但修复软骨损伤和改善疾病进程作用较弱,有效时间亦有限^[22-23]。

2 关节腔内注射单个核细胞(mononuclear cells, MNCs) 治疗 OA

MNCs 是指具有单个细胞核的细胞总称,包含有干、祖细胞等多种异质性细胞群。目前临床开展了骨髓 MNCs (bone marrow mononuclear cells, BM-MNCs) 和脂肪组织 MNCs 治疗 OA 的应用研究。

2.1 MNCs 的制备

2.1.1 BM-MNCs 的制备 BM-MNCs 又被称为骨髓浓缩物 (bone marrow aspirates concentrate, BMAC)^[30],是骨髓内具有 MNCs 的细胞混合群体,包含造血干细胞、造血祖细胞、间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs)、内皮祖细胞、巨噬细胞和单核细胞等^[31]。目前分离 BM-MNCs 方法,有密度梯度离心法、流式细胞分选法和免疫磁珠法等。由于密度梯度离心方法简单、污染机会少和操作时间短,是目前临床常用的方法。骨髓采集的部位,常选用髂嵴穿刺,抽取骨髓液 50 mL 左右放入抗凝管中。BM-MNCs 制备,应在良好生产质量管理规范 (GMP) 实验室进行。生理盐水等体积稀释骨髓液,缓慢加至已加入淋巴细胞分离液 (Ficoll) 的离心管中,室温低速离心,吸取 MNCs 层,移入离心管,补充稀释液吹打均匀,洗涤、离心 3 次,悬浮于 5~10 mL 生理盐水中备用^[32]。BMAC 制备方法和成分与 BM-MNCs 相似^[33]。目前尚无骨髓 MNCs 制备及质量标准的报道。

2.1.2 脂肪组织 MNCs 制备 脂肪组织 MNCs 是脂肪组织去除成熟脂肪细胞后,其余细胞成分,常被称为脂肪源性基质细胞 (adipose-derived stromal cell, ADSC) 或脂肪基质血管组分 (stromal vascular fraction, SVF),含有 MSCs、内皮祖细胞、内皮细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞、淋巴细胞、周细胞

和脂肪前体细胞 (pre-adipocytes) 等^[34-35]。脂肪组织 MNCs 的制备,一般通过腹部或者大腿内、外侧,抽吸的方法获取脂肪组织,常用酶消化法、推注破碎法和超声波法,破碎成熟脂肪细胞后,通过离心,获得 MNCs。脂肪组织 MNCs 制备应在 GMP 实验室进行。2021 年 11 月我国医药生物技术协会发布了《自体脂肪血管基质组分制备质量管理规范(征求意见稿)》,推荐胶原酶消化的 SVF 制备方法,并制定了“脂肪 SVF 制备质量控制指标”和“脂肪 SVF 放行关键质量指标”。但酶消化法由于不符合“最低实质性操作”原则,未被美国食品药品监督管理局和欧洲食品药品监督管理局批准用于临床,且存在影响细胞活力、成本高和可能因消化酶洗涤不充分而导致不良反应等问题,目前临床提倡 / 或仅能用非酶消化法分离 SVF^[35-36]。

2.2 关节腔内注射 MNCs 治疗 OA 的临床研究

临床研究发现,关节腔内注射 MNCs 治疗 OA,通过抑制促炎分子和分解代谢分子表达、促进抗炎和合成代谢分子分泌等机制^[37-38],具有较好的消炎、止痛、修复关节软骨损伤、促进软骨再生、阻止或延缓病程进展,从而发挥减轻疼痛和改善关节功能的作用^[40-53],其治疗效果可以维持 2~5 年^[52-54]。关节腔内注射 MNCs 治疗 OA 的并发症,仅见被注射关节的肿胀、疼痛和反应性积液,反应性积液出现率为 0.28%,均较轻微^[55]。Centeno 等^[56]研究了 518 例患者 616 次自体 BMACs 单独治疗膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA),关节肿胀和疼痛的发生率为 3.7%,而 Kim 等^[42]在 41 例患者、75 个膝关节,接受 BMACs 和腹部脂肪组织联合关节腔内注射治疗退行性膝关节炎后,69 个膝关节 (92.0%) 出现关节肿胀,31 个膝关节 (41.3%) 出现疼痛,两项研究差异较大,这可能与后者应用关节腔内注射 BMACs 和脂肪组织混合有关。

2.3 外周血 MNCs (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 治疗 OA 的实验研究

PBMCs 是外周血中具有单个核的细胞,主要包括单核细胞、免疫细胞和干 / 祖细胞。免疫细胞有 T/B 淋巴细胞、吞噬细胞和树突状细胞等;干 / 祖细胞占 MNCs 的 0.01%~0.10%,以造血干细胞为主,亦有部分 MSCs 和内皮祖细胞^[57]。干细胞动员后含量大量提高。PBMCs 的分离方法目前已经相对成熟,常用 Ficoll 密度梯度离心法和 Percoll 非连续密度梯度分离法。Ficoll 密度梯度离心法,由于操作简便和价格低廉等原因更为常用。2020 年中国医药生物技术协会发布了《人外周血单个核细胞的采集、分离和保存》的团体标准 (T/CMBA 011—2020),规定 Ficoll 密度梯度离心法分离人 PBMCs,并对质量控制提出要求,但没有提倡干细胞动员^[58]。Hopper 等^[59]利用 KOA 患者自体软骨细胞与自愿者 PBMCs 体外共培养的体外模型,划痕法研究了 PBMCs 促进软骨细胞迁移的效果与机制,结果显示, PBMCs 间接刺激 3 d 后,软骨细胞总迁移率提高 9.7 倍, PBMCs 直接共培养 3 d 后,软骨细胞总迁移率提高 8.2 倍;研究还发现, MMP9 和 IGF1 是 PBMCs 诱导软骨细胞迁移的主要调节因子。PBMCs 亦具有较好的抑制炎症的作用^[60]。但目前尚无 PBMCs 治疗 OA 的临床研究报道。

总之,关节腔内注射 MNCs 治疗 OA 效果肯定、副作用小和可接受度高;细胞获取操作简单、无需体外培养扩增、

便捷和经济;对医疗机构的级别和设施要求较低;具有较好的有效性、安全性和可行性;可以作为医疗技术在临床广泛开展。但是,目前 MNCs 注射剂量、次数和观察指标不统一,缺乏质量控制标准。另外,目前临床仅开展了骨髓和脂肪 MNCs 治疗 OA 的研究,而实验研究发现,外周血 MNCs 具有抗炎和促进软骨细胞迁移的作用,且获取创伤小、方便和患者接受度高,应是 MNCs 治疗 OA 临床研究的新方向。

3 关节腔内注射干细胞制剂治疗 OA

干细胞是一类具有自我更新和多向分化潜能的细胞,依据分化程度分为胚胎干细胞和成体干细胞两大类。MSCs 是成体干细胞家族的重要成员,来源于发育早期的中胚层,是临床应用的主要干细胞类型,具有免疫调节、抗炎、活化细胞、修复病损的组织细胞和多向分化的功能。腔内注射干细胞制剂治疗 OA,目前研究主要涉及 MSCs 和外泌体。

3.1 干细胞的制备

MSCs 的制备,根据组织来源和制备方法划分。液体组织一般采用梯度离心法,分离出 MNCs 进行培养,根据差速贴壁等方法纯化 MSCs。固体组织一般采用酶消化法和超声波法等,获取有核细胞进行培养,再根据差速贴壁等方法纯化 MSCs,或采用组织贴片法培养 MSCs^[61]。规范化临床级 MSCs 的制备,是临床治疗安全性及有效性的保障,我国学者早在 2012 和 2013 年即进行了临床级 MSCs 制备方法及其质量控制等方面的研究,提出前 3 代细胞以含血清的培养基进行培养,之后换无血清培养基继续培养,去除血清残留,以提高 MSCs 治疗的安全性,并提出临床治疗应严格控制在早期代数内 MSCs 的建议^[62-63];之后中华人民共和国国家卫生健康委员会、国家药品监督管理局,先后颁布了《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》、《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则》、《人源性干细胞及其衍生产品临床试验技术指导原则(征求意见稿)》,中国医药生物技术协会发布了《干细胞来源伦理评估指导原则》团体标准,中国细胞生物学学会发布了《干细胞通用要求》团体标准,中国人民解放军器官移植研究所 / 全军组织修复与器官重建重点实验室发布了《间充质干细胞制备及质量控制技术规范(征求意见稿)》等规范及指导原则,对临床级 MSCs 取材、制备、储存、复苏、运输和质量控制等的要求与方法进行了界定。因此,目前我国对临床级 MSCs 的制备及应用均有法可依、有规可循。

3.2 关节腔内注射干细胞治疗 OA 的临床研究

关节腔内注射干细胞治疗 OA,是目前 OA 治疗研究的前沿和热点,国外已有新药 (Cartistem, 脐血 MSCs) 批准上市,13 款治疗 OA 的干细胞新药进入临床试验 (Clinical Trials gov, 2021.10.20);我国 4 种治疗 OA 的干细胞新药获得临床试验许可,6 项治疗 OA 的干细胞产品获临床研究项目备案。

目前报道的用于治疗 OA 有自体 / 异体骨髓源性 MSCs,自体 / 异体脂肪源性 MSCs、脐带 MSCs (umbilical cord mesenchymal stem cells, UMSCs)、脐带血 MSCs、胎盘 MSCs 和滑膜 MSCs (synovial mesenchymal stem cell, SSMSCs)。研究证明, MSCs 治疗 OA 具有消炎、止痛、修复关节软骨损伤、促进软骨再生、阻止 / 延缓病程进展和提高

关节功能的作用^[64-65],且效果维持时间较长。Park等^[65]报道随访7年,维持干细胞治疗后的疼痛VAS评分和IKDC膝关节主观评分没有明显改变,治疗效果比MNCs好^[66]。

Matas等^[67]在一项UMSCs治疗膝关节OA对照随机I/II期试验中发现,40例40~65岁、每日疼痛至少3个月、Kellgren Lawrence影像学改变为1级到3级的招募者,在接受膝关节腔内注射2次 20×10^6 个细胞浓度的UMSCs治疗后,疼痛分量表(WOMACA)水平、VAS(疼痛量表)和总WOMAC显著降低,效果明显优于透明质酸,部分患者出现关节积液和疼痛,但均为短暂性,休息或口服乙酰氨基酚后改善。

一般认为,不同来源的MSCs治疗OA的效果没有明显差异^[68],但SMSCs可能优于脐带血SMCs^[69]。干细胞剂量与效果的关系,低剂量治疗早期止痛效果较好;高剂量治疗早期容易引起不良反应,如局部疼痛和肿胀,但修复软骨损伤和促进软骨再生效果好,且改善临床疗效方面更持久^[70-71]。单次和多次注射干细胞临床疗效无明显差异,但多次注射更能延缓软骨减少^[72]。干细胞治疗OA的安全性较好,随访11年均未观察到肿瘤或感染^[73],常见的不良反应有注射关节的疼痛、肿胀和膝关节积液等,均可在数天内自行缓解^[74]。

3.3 干细胞外泌体(exosome)治疗OA的实验研究

外泌体是由细胞分泌,包含蛋白质、脂质、mRNA、microRNA和DNA等多种生物活性分子,直径约为40~100 nm,由磷脂双分子层膜包裹的小囊泡,是介导细胞通讯的关键性分泌因子。外泌体治疗OA是目前的研究热点。鉴于MSCs治疗OA的有效性主要通过旁分泌发挥作用,而MSCs外泌体(mesenchymal stem cell exosomes, MSCs-EXOs)是MSCs旁分泌作用中的一种重要物质。目前外泌体治疗OA的研究主要集中在MSCs-Exo,胚胎干细胞源性MSCs、诱导性多能干细胞源性MSCs、BM-MSCs、脂肪MSCs、羊膜MSCs和脐带MSCs。MSCs-EXOs的制备有超速离心法、超滤法、凝胶色谱法、免疫磁珠法和试剂盒提取法,各有其优缺点,近年来市场上出现了不少商品化的外泌体抽提试剂盒,主要原理是通过排除色谱和化合物共沉淀等方法对外泌体进行纯化分离,方便快捷、纯度和产率高。MSCs-EXOs治疗OA的研究发现,关节腔内注射MSCs-EXOs,具有抗炎、减缓软骨细胞外基质的降解、降低软骨细胞凋亡、促进损伤软骨修复与再生和延缓病程进展的作用^[75-76]。但目前仅限于实验研究,尚未见临床研究的报道。

MSCs的制备技术成熟,治疗OA已有大量临床研究报道,有效性和安全性得到肯定,可能是将来治疗OA的新趋势,但目前仅限于MSCs治疗OA的产品研发和应用研究,其治疗机制、效果维持时间和体内演变规律等问题尚有待深入研究。MSCs-EXOs治疗OA动物实验展现了较好的前景,有待进行临床应用研究。

4 总结与展望

目前关节腔内注射细胞制剂治疗OA已进行广泛和深入的研究,无论PRP、MNCs还是MSCs,都展现了良好的治疗效果和安全性,是值得推广的一种较理想的治疗方案。血小板制剂治疗OA具有较好止痛和改善关节功能的作用,

制备简单和所需设备少,但疗效维持时间较短,对修复软骨作用较弱,适应于基层医疗机构和早期OA患者的治疗。MNCs治疗OA具有较好的有效性、安全性和可行性,且细胞获取操作简单、无需体外培养扩增的一些生长因子和细胞因子,可能有助于关节内的抗炎作用,但软骨再生能力较MSCs治疗低,蛋白多糖损失较MSCs高^[77],可能更适用于没有干细胞培养条件的医疗机构和中期OA患者应用。MSCs是治疗OA效果最为理想的细胞类型,特别是在延缓病程进展、修复软骨损伤和促进软骨再生方面具有较好的效果,且疗效维持时间长,但MSCs需要体外培养扩增,时间长、成本高,更适合高级别医疗机构和晚期OA患者应用。

虽然目前腔内注射细胞产品治疗OA是研究的前沿和热点,但大多随访时间短、样本量少、随机对照实验少且多为单中心研究;注射剂量、次数和观察指标混乱,没有统一标准,为评价其结果造成影响;特别是缺乏细胞制剂质量控制标准,导致不良反应出现率差别较大。笔者认为,制定腔内注射治疗OA不同细胞制剂的质量控制标准、临床应用标准和大样本多中心随机对照临床试验势在必行。另外,深入进行细胞制剂治疗OA的分子机制研究、外泌体治疗OA的临床研究和外周血MNCs治疗OA的研究,应当是目前进行探索的新切入点和新方向。

参 考 文 献

- 詹红生,潘富伟. 膝骨关节炎治疗中不可或缺的基础治疗 --《膝骨关节炎中医诊疗指南(2020年版)》解读[J]. 中医正骨, 2021, 33(8):1-6.
- Born GVR. Evidence for the formation of a labile phospholipoprotein during the clotting of platelet-rich plasma[J]. Nature, 1957, 180(4585): 546-547.
- Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, 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.
- Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Mishra A. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2012, 13(7):1131-1137.
- Dohan Ehrenfest DM, Rasmussen L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF)[J]. Trends Biotechnol, 2009, 27(3):158-167.
- 宣力,田举,宣敏,等. 二次离心法制备富血小板血浆中血小板相关参数的分析[J]. 华南国防医学杂志, 2017, 31(8):514-517.
- 赵露婷,方其林,唐海燕,等. 自体、同种异体纯化富血小板血浆治疗兔膝关节炎的差异[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(26):4123-4129.
- Everts PA, Malanga GA, Paul RV, et al. Assessing clinical implications and perspectives of the pathophysiological effects of erythrocytes and plasma free hemoglobin in autologous biologics for use in musculoskeletal regenerative medicine therapies. A review[J]. Regen Ther, 2019, 11:56-64.
- 王世春,黄梅,张强,等. 血小板裂解液的制备及生物学效应观察[J]. 中国输血杂志, 2016, 29(2):123-127.
- 刘广亚,许育兵,张喻,等. 不同冻融条件下血小板裂解液的制备[J]. 中国输血杂志, 2019, 32(6):545-548.
- Everts P, Onishi K, Jayaram P, et al. Platelet-rich plasma: New

- performance understandings and therapeutic considerations in 2020[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20):7794. doi: 10.3390/ijms21207794.
- 12 vanBuu GM, Koevoet WL, Kops N, et al. Platelet-rich plasma releasate inhibits inflammatory processes in osteoarthritic chondrocytes[J]. *Am J Sports Med*, 2011, 39(11):2362-2370.
- 13 Sakata R, Reddi AH. Platelet-rich plasma modulates actions on articular cartilage lubrication and regeneration[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2016, 22(5):408-419.
- 14 Sampson S, Reed M, Silvers H, et al. Injection of platelet-rich plasma in patients with primary and secondary knee osteoarthritis: a pilot study[J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2010, 89(12):961-969.
- 15 辛忍, 权冬, 张冰, 等. 自体富血小板血浆治疗膝骨关节炎的临床效果[J]. *临床医学研究与实践*, 2021, 6(9):35-37.
- 16 Raeissadat SA, Rayegani SM, Hassanabadi H, et al. Knee osteoarthritis injection choices: platelet-rich plasma (PRP) versus hyaluronic acid (a one-year randomized clinical trial)[J]. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*, 2015, 8:1-8.
- 17 潘磊, 蔡东成, 吴刚. 乏白细胞富血小板血浆与富白细胞富血小板血浆对兔牙髓间充质干细胞增殖和成骨分化的影响[J]. *山东医药*, 2018, 58(36):50-53.
- 18 谢雪涛, 沈龙祥, 陈圣宝, 等. 关节内注射富血小板血浆治疗膝骨关节炎的 Meta 分析[J/CD]. *中华关节外科杂志(电子版)*, 2016, 10(6):46-54.
- 19 Shen L, Yuan T, Chen, S et al. The temporal effect of platelet-rich plasma on pain and physical function in the treatment of knee osteoarthritis: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *J Orthop Surg Res*, 2017, 12(1):16. doi: 10.1186/s13018-017-0521-3.
- 20 Vilchez-Cavazos F, Millán-Alanís JM, Blázquez-Saldaña J, et al. Comparison of the clinical effectiveness of single versus multiple injections of platelet-rich plasma in the treatment of knee osteoarthritis: A systematic review and Meta-analysis[J]. *Orthop J Sports Med*, 2019, 7(12):2325967119887116. doi: 10.1177/2325967119887116.
- 21 Dai WL, Zhou AG, Zhang H, et al. Efficacy of platelet-rich plasma in the treatment of knee osteoarthritis: A Meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Arthroscopy*, 2017, 33(3):659-670.
- 22 Filardo G, Kon E, Roffi A, et al. Platelet-rich plasma: why intra-articular? A systematic review of preclinical studies and clinical evidence on PRP for joint degeneration[J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2015, 23(9):2459-2474.
- 23 Filardo G, Kon E, Buda R, et al. Platelet-rich plasma intra-articular knee injections for the treatment of degenerative cartilage lesions and osteoarthritis[J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2011, 19(4):528-535.
- 24 Al-Ajlouni J, Awidi A, Samara O, et al. Safety and efficacy of autologous intra-articular platelet lysates in early and intermediate knee osteoarthritis in humans: A prospective open-label study[J]. *Clin J Sport Med*, 2015, 25(6):524-528.
- 25 邓小军, 叶永清, 林秀妹, 等. 浓缩血小板制备血小板裂解液及其质量特性的初步研究[J]. *中国输血杂志*, 2017, 30(10):1143-1145.
- 26 侯燕, 秦立武, 鞠昌军, 等. 血小板裂解液关节腔注射治疗膝骨性关节炎的临床观察[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2017, 25(11):29-32.
- 27 严伟, 刘海宁, 宋修刚, 等. 关节腔内重复注射血小板裂解液治疗早期膝骨关节炎疗效观察[J]. *中国运动医学杂志*, 2017, 36(10):906-909.
- 28 鞠昌军, 姜红江, 高广凌, 等. 体外人工膝支具辅助血小板裂解液治疗膝骨性关节炎的临床疗效分析[J/CD]. *中华老年骨科与康复电子杂志*, 2018, 4(4):224-230.
- 29 鞠昌军, 严伟, 赵锦伟, 等. 血小板裂解液与富血小板血浆治疗膝骨性关节炎的临床研究[J/CD]. *中华关节外科杂志(电子版)*, 2020, 14(5):565-571.
- 30 Estrada E, Décima JL, Rodríguez M, et al. Patient-reported outcomes after platelet-rich plasma, bone marrow aspirate, and adipose-derived mesenchymal stem cell injections for symptomatic knee osteoarthritis[J]. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*, 2020, 13:1179544120931086. doi: 10.1177/1179544120931086.
- 31 Soltan M, Smiler D, Choi JH. Bone marrow: orchestrated cells, cytokines, and growth factors for bone regeneration[J]. *Implant Dent*, 2009, 18(2):132-141.
- 32 Goncars V, Kalnberzs K, Jakobsons E, et al. Treatment of knee osteoarthritis with bone marrow-derived mononuclear cell injection: 12-month follow-up[J]. *Cartilage*, 2019, 10(1):26-35.
- 33 Estrada E, Décima JL, Rodríguez M, et al. Patient-reported outcomes after platelet-rich plasma, bone marrow aspirate, and adipose-derived mesenchymal stem cell injections for symptomatic knee osteoarthritis[J]. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*, 2020, 13:1179544120931086. doi: 10.1177/1179544120931086.
- 34 Zhang Y, Cai J, Zhou T, et al. Improved long term volume retention of stromal vascular fraction gel grafting with enhanced angiogenesis and adipogenesis[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2018, 141(5):676e-686e.
- 35 Senesi L, De Francesco F, Farinelli L, et al. Mechanical and enzymatic procedures to isolate the stromal vascular fraction from adipose tissue: preliminary results[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7(7):88. doi: 10.3389/fcell.2019.00088.
- 36 李智国, 张方方, 刘悦, 等. 基质血管组分(SVF)临床分离技术研究[J]. *中国细胞生物学学报*, 2021, 43(1):73-82.
- 37 Nees TA, Rosshirt N, Reiner T, et al. Inflammation and osteoarthritis-related pain[J]. *Schmerz*, 2019, 33(1):4-12.
- 38 Lapuente JP, Dos-Anjos S, Blázquez-Martínez A. Intra-articular infiltration of adipose-derived stromal vascular fraction cells slows the clinical progression of moderate-severe knee osteoarthritis: hypothesis on the regulatory role of intra-articular adipose tissue[J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15(1):137. doi: 10.1186/s13018-020-01664-z.
- 39 Goncars V, Kalnberzs K, Jakobsons E, et al. Treatment of knee osteoarthritis with bone marrow-derived mononuclear cell injection: 12-month follow-up[J]. *Cartilage*, 2019, 10(1):26-35.
- 40 Rodríguez-Fontan F, Piuze NS, Kraeutler MJ, et al. Early clinical outcomes of intra-articular injections of bone marrow aspirate concentrate for the treatment of early osteoarthritis of the hip and knee: A cohort study[J]. *PM R*, 2018, 10(12):1353-1359.
- 41 Themistocleous GS, Chloros GD, Kyranzoulis IM, et al. Effectiveness of a single intra-articular bone marrow aspirate concentrate (BMAC) injection in patients with grade 3 and 4 knee osteoarthritis[J]. *Heliyon*, 2018, 4(10):e00871. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00871.
- 42 Kim JD, Lee GW, Jung GH, et al. Clinical outcome of autologous bone marrow aspirates concentrate (BMAC) injection in degenerative arthritis of the knee[J]. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 2014, 24(8):1505-1511.
- 43 Santoprete S, Marchetti F, Rubino C, et al. Fresh autologous stromal tissue fraction for the treatment of knee osteoarthritis related pain and disability[J]. *Orthop Rev (Pavia)*, 2021, 13(1):9161. doi: 10.4081/or.2021.9161.
- 44 Mehling B, Hric M, Salatkova A, et al. A retrospective study of stromal vascular fraction cell therapy for osteoarthritis[J]. *Clin Med Res*, 2020, 12(11):747-751.
- 45 Garza JR, Campbell RE, Tjoumakaris FP, et al. Clinical efficacy of intra-articular mesenchymal stromal cells for the treatment of knee osteoarthritis: A double-blinded prospective randomized controlled clinical trial[J]. *Am J Sports Med*, 2020, 48(3):588-598.
- 46 Mehranfar S, Abdi Rad I, Mostafaei E, et al. The use of stromal vascular fraction (SVF), platelet-rich plasma (PRP) and stem cells in the treatment of osteoarthritis: an overview of clinical trials[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1):882-890.
- 47 Pak J. Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-

- derived stem cells:a case series[J]. *J Med Case Rep*, 2011, 5:296.doi: 10.1186/1752-1947-5-296.
- 48 Bansal H, Comella K, Leon J, et al. Intra-articular injection in the knee of adipose derived stromal cells (stromal vascular fraction) and platelet rich plasma for osteoarthritis[J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1):141. doi: 10.1186/s12967-017-1242-4.
 - 49 Koh YG, Choi YJ, Kwon SK, et al. Clinical results and second-look arthroscopic findings after treatment with adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2015, 23(5):1308-1316.
 - 50 Tran TDX, Wu CM, Dubey NK, et al. Time- and Kellgren-Lawrence grade-dependent changes in intra-articularly transplanted stromal vascular fraction in osteoarthritic patients[J]. *Cells*, 2019, 8(4):308.doi: 10.3390/cells8040308.
 - 51 Fodor PB, Paulseth SG. Adipose derived stromal cell (ADSC) injections for pain management of osteoarthritis in the human knee joint[J]. *Aesthet Surg J*, 2016, 36(2):229-236.
 - 52 Tsubosaka M, Matsumoto T, Sobajima S, et al. The influence of adipose-derived stromal vascular fraction cells on the treatment of knee osteoarthritis[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2020, 21(1):207.doi: 10.1186/s12891-020-03231-3.
 - 53 Gobbi A, Whyte GP. One-stage cartilage repair using a hyaluronic acid-based scaffold with activated bone marrow-derived mesenchymal stem cells compared with microfracture:Five-year follow-up[J]. *Am J Sports Med*, 2016, 44(11):2846-2854.
 - 54 Skowroński J, Skowroński R, Rutka M. Large cartilage lesions of the knee treated with bone marrow concentrate and collagen membrane--results[J]. *Ortop Traumatol Rehabil*, 2013, 15(1):69-76.
 - 55 Shanmugasundaram S, Vaish A, Chavada V, et al. Assessment of safety and efficacy of intra-articular injection of stromal vascular fraction for the treatment of knee osteoarthritis-a systematic review[J]. *Int Orthop*, 2021, 45(3):615-625.
 - 56 Centeno C, Pitts J, Al-Sayegh H, et al. Efficacy of autologous bone marrow concentrate for knee osteoarthritis with and without adipose graft[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:370621.doi: 10.1155/2014/370621.
 - 57 Bourguignon P, Clément F, Renaud F, et al. Processing of blood samples influences PBMC viability and outcome of cell-mediated immune responses in antiretroviral therapy-naïve HIV-1-infected patients[J]. *J Immunol Methods*, 2014, 414 :1-10.
 - 58 中国医药生物技术协会. 人外周血单个核细胞的采集、分离和保存[J]. *中国医药生物技术*, 2021, 16(1):85-93.
 - 59 Hopper N, Henson F, Brooks R, et al. Peripheral blood derived mononuclear cells enhance osteoarthritic human chondrocyte migration[J]. *Arthritis Research Therapy*, 2015, 17(1):199. doi: 10.1186/s13075-015-0709-z.
 - 60 Masuda H, Tanaka R, Fujimura S, et al. Vasculogenic conditioning of peripheral blood mononuclear cells promotes endothelial progenitor cell expansion and phenotype transition of anti-inflammatory macrophage and T lymphocyte to cells with regenerative potential[J]. *J Am Heart Assoc*, 2014, 3(3):e000743. doi: 10.1161/JAHA.113.000743.
 - 61 陈凤, 杨敏, 李彦洁, 等. 人脐带间充质干细胞的分离培养及多向分化潜能研究 [J]. *生物学杂志*, 2021, 38(5):82-85.
 - 62 张文成, 王樞芳, 常铭洋, 等. 临床研究用 间充质干细胞的体外制备策略 [J]. *中国医药生物技术*, 2012, 7(5):327-332.
 - 63 陈津, 马予洁, 郭子宽, 等. 临床级间充质干细胞培养规范 [J/CD]. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)*, 2013, 3(3):144-148.
 - 64 Bastos R, Mathias M, Andrade R, et al. Intra-articular injection of culture-expanded mesenchymal stem cells with or without addition of platelet-rich plasma is effective in decreasing pain and symptoms in knee osteoarthritis:a controlled, double-blind clinical trial[J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2020, 28(6):1989-1999.
 - 65 Park YB, Ha CW, Lee CH, et al. Cartilage regeneration in osteoarthritic patients by a composite of allogeneic umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and hyaluronate hydrogel:Results from a clinical trial for safety and proof-of-concept with 7 years of extended follow-up[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(2):613-621.
 - 66 Yokota N, Hattori M, Ohtsuru T, et al. Comparative clinical outcomes after intra-articular injection with adipose-derived cultured stem cells or noncultured stromal vascular fraction for the treatment of knee osteoarthritis[J]. *Am J Sports Med*, 2019, 47(11):2577-2583.
 - 67 Matas J, Orrego M, Amenabar D, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells (MSCs) for knee osteoarthritis:repeated MSC dosing is superior to a single MSC dose and to hyaluronic acid in a controlled randomized phase I/II trial[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(3):215-224.
 - 68 Lopa S, Colombini A, Moretti M, et al. Injective mesenchymal stem cell-based treatments for knee osteoarthritis:from mechanisms of action to current clinical evidences[J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2019, 27(6):2003-2020.
 - 69 陈子秋, 刘顺贵, 刘义, 等. 关节腔内注射滑膜源间充质干细胞对膝关节软骨损伤的疗效 [J]. *中国临床研究*, 2018, 31(9):1232-1235.
 - 70 Gupta PK, Chullikana A, Rengasamy M, et al. Efficacy and safety of adult human bone marrow-derived, cultured, pooled, allogeneic mesenchymal stromal cells (Stempeucel(R)):Preclinical and clinical trial in osteoarthritis of the knee joint[J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18(1):301. doi: 10.1186/s13075-016-1195-7.
 - 71 de Windt TS, Vonk LA, Slaper-Cortenbach ICM, et al. Allogeneic MSCs and recycled autologous chondrons mixed in a one-stage cartilage cell transplantation:A first-in-man trial in 35 patients[J]. *Stem Cells*, 2017, 35(8):1984-1993.
 - 72 Freitag J, Bates D, Wickham J, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of knee osteoarthritis:A randomized controlled trial[J]. *Regen Med*, 2019, 14(3):213-230.
 - 73 Wakitani S, Okabe T, Horibe S, et al. Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2011, 5(2):146-150.
 - 74 Jiang P, Mao L, Qiao L, et al. Efficacy and safety of mesenchymal stem cell injections for patients with osteoarthritis:a meta-analysis and review of RCTs[J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2021, 141(7):1241-1251.
 - 75 Wang Y, Yu D, Liu Z, et al. Exosomes from embryonic mesenchymal stem cells alleviate osteoarthritis through balancing synthesis and degradation of cartilage extracellular matrix[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1):189. doi:10.1186/s13287-017-0632-0.
 - 76 Wong KL, Zhang S, Wang M, et al. Intra-articular injections of mesenchymal stem cell exosomes and hyaluronic acid improve structural and mechanical properties of repaired cartilage in a rabbit model[J]. *Arthroscopy*, 2020, 36(8): 2215-2228.
 - 77 Song FL F, Tang J, Geng R, et al. Comparison of the efficacy of bone marrow mononuclear cells and bone mesenchymal stem cells in the treatment of osteoarthritis in a sheep model[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(4):1415-1426.

(收稿日期:2021-11-10)

(本文编辑:陈媛媛)