

## 间充质干细胞治疗骨性关节炎的研究现状及问题

文涛, 郑诗豪, 董纪元

解放军总医院 骨科, 北京 100853

**摘要:** 退行性骨关节炎是一种以疼痛为主要症状的慢性疾病, 目前没有有效的方法减缓退行性关节疾病的发展。间充质干细胞具有治愈骨性关节炎的潜能。本文概述了间充质干细胞治疗骨性关节炎的实验进展、间充质干细胞的最佳来源、导入体内途径、治疗需要的细胞数目及治疗效果的质疑与讨论, 就间充质干细胞治疗骨性关节炎的研究现状及遇到的问题作一综述。

**关键词:** 间充质干细胞; 骨性关节炎; 干细胞疗法

**中图分类号:** R 684.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-5227(2017)06-0559-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-5227.2017.06.018

**网络出版时间:** 2017-04-11 15:50

**网络出版地址:** http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20170411.1550.012.html

### Status quo and argument of mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis

WEN Tao, ZHENG Shihao, DONG Jiyuan

Department of Orthopedics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: DONG Jiyuan. Email: dongjiyuan81301@163.com

**Abstract:** Osteoarthritis is a type of chronic degenerative disease with pain as the most common symptom. Currently, no effective therapies can reverse its underlying process. Mesenchymal stem cells(MSCs) are capable of differentiating to various musculoskeletal tissues, and have been proposed as a potential regenerative cell therapy source for osteoarthritis. This review is to summarize the development of MSC-based therapies to osteoarthritis including the source, administration route, amount of MSCs required by treatment, and therapeutic effect. Argument and difficulties encountered are also discussed.

**Keywords:** mesenchymal stem cells; osteoarthritis; stem cell therapy

在各类退行性关节疾病中, 骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是最常见的一种慢性疾病, 可以影响全身各关节组织<sup>[1]</sup>。治疗骨性关节炎的方法不多, 药物及非手术治疗效果不佳, 关节置换手术是晚期不得已的选择。有人提出利用间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)治疗包括骨性关节炎在内的各种退行性骨骼肌肉疾病<sup>[2]</sup>。间充质干细胞广泛存在于各类组织中, 通过诱导可以迅速分化成为成骨细胞或软骨细胞, 修复受损伤的骨和软骨<sup>[3]</sup>。目前各类研究的重点倾向于找出间充质干细胞的最佳取材来源, 以及利用多孔支架和生物基质技术最大化激发间充质干细胞的分化潜能和免疫调节功能<sup>[4]</sup>。本文旨在总结现今间充质干细胞治疗骨性关节炎的研究进展和遇到的问题。

#### 1 间充质干细胞的特性

Friedenstein首先从骨髓中发现并提取了间充质干细胞。进一步研究发现这些细胞来源于中胚层, 具有向多种细胞分化的潜能, 可以分化为骨、软骨、脂肪或肌肉等<sup>[5]</sup>。间充质干细胞的生物异质性决定了其没有单独的标记物用于鉴定和分离, 需几种阳性及阴性抗体同时标记。国际细胞治疗协会(International Society of Cellular Therapy, ISCT)认

为鉴定间充质干细胞需满足3个条件: 能贴壁生长及体外增殖; 表达CD73、CD90及CD105, 不表达CD34、CD45、CD14或者CD11b、CD79 $\alpha$ 或CD19、HLA-DR; 可以分化为骨、软骨或脂肪等<sup>[6]</sup>。Glenn<sup>[7]</sup>发现间充质干细胞参与局部免疫调节机制, 可以抑制T细胞增殖, 抑制单核细胞和髓样树突状细胞发育成熟, 抑制B细胞的活化、增殖、趋化因子受体表达和向分泌抗体细胞的分化。间充质干细胞可以分泌大量酶和因子, 如血管内皮生长因子、血小板源性生长因子及肝细胞生长因子等, 在抗细胞衰老、促进现有细胞的存活和修复方面发挥重要作用<sup>[8-11]</sup>。

#### 2 间充质干细胞治疗骨性关节炎的实验

Brittberg等<sup>[12]</sup>从20世纪90年代开始利用自体软骨细胞修复软骨损伤, 并取得一定效果, 而且在培养过程中会逐渐去分化, 因此越来越多的研究开始关注间充质干细胞。间充质干细胞可以分化为各种组织, 修复关节表面软骨和软骨下骨损伤, 对肌肉和韧带的损伤恢复也有帮助<sup>[3,7]</sup>。Akgun等<sup>[13]</sup>对14例骨性关节炎患者的治疗中, 对比自体骨髓间充质干细胞和软骨细胞的修复效果, 发现接受间充质干细胞治疗的患者KOOS及VAS评分改善更显著。Wakitani等<sup>[14]</sup>利用间充质干细胞进行临床试验, 试验组将混有自体骨髓来源间充质干细胞的胶原蛋白凝胶植入患者的关节软骨损伤处, 对照组只植入等量胶原蛋白凝胶, 两组患者关节功能均得到改善, 但是只有试验组在损伤处发现透明软骨生成。Wakitani等<sup>[15]</sup>对41例接受间充质干细胞治疗的患者进行长达11年的随访, 未发现任何严重的并发症。Reyes

收稿日期: 2017-02-17

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81301564)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81301564)

作者简介: 文涛, 男, 硕士, 医师。研究方向: 人工关节置换。

Email: wentao247@126.com

通信作者: 董纪元, 男, 学士, 主任医师, 硕士生导师。Email: dongjiyuan81301@163.com

等<sup>[16]</sup>将结合有骨形态发生蛋白-2的间充质干细胞导入到兔的关节软骨缺损处,6周后观察发现缺损处有软骨细胞生成,并且与临近的正常软骨细胞非常相似。Murdoch等<sup>[17]</sup>利用Transwell膜培养并诱导人骨髓间充质干细胞,4周后发现有关节的透明软骨生成,并检测出2型胶原和蛋白多糖。

### 3 治疗骨性关节炎间充质干细胞的最佳来源

间充质干细胞分布广泛,已知可以从骨髓、脂肪、软骨、滑膜、关节液、骨膜等提取间充质干细胞<sup>[5]</sup>。不同来源间充质干细胞分化潜能不同,哪种组织来源的细胞对骨性关节炎的治疗效果最好一直是研究的热点。骨髓是目前最常见的间充质干细胞来源,Nejadnik等<sup>[18]</sup>对接受ACI和骨髓间充质干细胞治疗的患者进行队列研究,发现骨髓间充质干细胞修复关节软骨损伤效果更佳,可有效改善患者的症状。但其分化潜力随着扩增次数的增加而降低,并且从骨髓收集细胞会引起供者术区疼痛不适<sup>[19]</sup>。脂肪间充质干细胞也表现出与骨髓间充质干细胞相似的特性,其优势在于易于获取,与100 ml骨髓相比,100 g脂肪中可获得高达300倍的间充质干细胞<sup>[20]</sup>。Bianchi等<sup>[21]</sup>发明了一种仪器,能够从很小的脂肪组织中分离出富含间充质干细胞又带有完整血管的脂肪提取物,临床开始研究将这种自体提取物直接进行关节注射修复损伤<sup>[22]</sup>。类似骨髓间充质干细胞,经过长期培养扩增或冷冻保存的脂肪间充质干细胞,生存能力与分化潜能均下降<sup>[5]</sup>。有研究发现滑膜间充质干细胞比骨髓和脂肪间充质干细胞有更高的软骨分化潜能<sup>[23]</sup>。一系列研究向切除半月板、软骨损伤造模的大鼠、兔、猪和猩猩的关节中注射滑膜间充质干细胞,发现半月板和内侧股骨受损软骨得到修复<sup>[24-25]</sup>。Sekiya等<sup>[26]</sup>对利用滑膜间充质干细胞治疗骨性关节炎患者并进行了3年的随访,发现MRI、组织学评价及Lysholm评分等方面均得到改善。Jones等<sup>[27]</sup>在关节液中发现间充质干细胞,相比骨髓间充质干细胞有更高的增殖能力和更低的向脂肪分化潜能。

大多数临床试验倾向于使用自体间充质干细胞,因安全性较高而且不涉及伦理学问题。但有些研究认为异体优质间充质干细胞治疗疾病效果更佳。Sordi和Piemonti<sup>[28]</sup>发现间充质干细胞对NK细胞、T细胞及B细胞均有抑制作用,为同种异体间充质干细胞移植创造可能。Vega等<sup>[29]</sup>利用3名健康成年志愿者的间充质干细胞对30例骨性关节炎患者进行治疗,在损伤的修复体积评估结果中,同种异体干细胞比自体脂肪来源间充质干细胞修复效果更优,疼痛缓解明显。

### 4 间充质干细胞导入体内的途径

目前治疗骨性关节炎多采用直接向关节腔内注射间充质干细胞,但采用一步植入还是分步植入尚有争议。对于骨髓和脂肪间充质干细胞,直接注射植入技术更加简便易行,细胞扩增后混在基质内注入关节腔即可<sup>[30]</sup>。分步方法需要先在体外将细胞分离、鉴定和提纯,然后标准化生产,再注射或者利用支架导入体内。这样能保证细胞质量,植入的细胞数目也可以精确控制,但费时费力且花费较高,

也有人担心对细胞的过度处理会影响细胞的分化潜能,影响治疗效果<sup>[31]</sup>。完美的干细胞移植载体应该具有与人体的生物相容性、损伤治愈后的生物降解性、液气及营养物质的渗透性、多孔隙便于细胞植入、保证一定的机械强度及对骨及软组织的易贴服性。现在的支架及生物基质并没有完全达到要求,而且临床试验随访时间仍较短。Noth等<sup>[32]</sup>正在研究将胶原蛋白、透明质酸、藻酸盐及脱乙酰几丁质等制成水凝胶,再与高分子材料合成复合支架用作细胞载体。一些研究在生物基质中放入不同生长因子来优化容纳干细胞的微环境。

### 5 治疗所需间充质干细胞的数目

植入体内的干细胞数量是影响预后的重要因素。大部分利用骨髓来源间充质干细胞的研究认为,收集 $10 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6$ 的数目最为合适,最低必须达到 $8 \times 10^6$ 个间充质干细胞才可以发挥修复损伤的作用<sup>[33]</sup>。Davatchi等<sup>[34]</sup>使用了 $8 \times 10^6$ 个干细胞进行试验,治疗效果并不理想,该研究认为至少 $10 \times 10^6$ 个间充质干细胞才是修复损伤的保障。有研究显示,脂肪间充质干细胞要求数目略少于骨髓间充质干细胞。Koh和Choi<sup>[35]</sup>使用 $1.89 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 个脂肪间充质干细胞进行膝关节骨性关节炎的治疗,疾病症状均得到改善,但是结果有争论,Jo等<sup>[36]</sup>认为这些数量的脂肪来源间充质干细胞并不足以使损伤得到修复。

### 6 对间充质干细胞治疗效果的质疑和讨论

有研究怀疑间充质干细胞能加剧关节内微环境改变,加重骨关节炎的发展。Murphy等<sup>[37]</sup>认为,骨性关节炎患者关节内间充质干细胞的增殖与分化能力随关节损伤程度加重而降低,这种变化具有特异性,成软骨及脂肪能力下降,成骨能力上升。这一研究现大部分基于骨髓来源的间充质干细胞,其他来源的间充质干细胞研究也显示类似结果。软骨细胞的分解大于合成,软骨缺损明显,间充质干细胞成骨分化导致骨质增生加重。骨坏死患者坏死区域的间充质干细胞成软骨及脂肪能力提升,而成骨修复能力却下降,这与在骨关节炎中观察得到的结果正好相反,细胞成骨能力下降,意味着疾病向加重方向发展<sup>[38]</sup>。可能因为骨关节炎和骨坏死的病理生理发展不同,细胞的微环境发生改变,间充质干细胞表现的分化潜能也不一样。有报道对骨髓间充质干细胞成软骨诱导分化后,会瞬时形成脆弱的纤维软骨组织或经历终末分化形成钙化软骨,甚至软骨下骨过度生长形成骨赘,其他来源的间充质干细胞也在进行相应实验研究。

尽管大多数研究认同间充质干细胞能够修复关节表面损伤的结论。但是Barry和Murphy<sup>[39]</sup>认为,间充质干细胞的功能其实来源于其旁分泌机制,尽管在注射间充质干细胞后关节表面得到修复,但修复损伤的细胞主要来源于关节本身的细胞,只有少量外来细胞参与具体修复过程,间充质干细胞不是专门替换受伤与丢失的组织,而是协调和增强了这种修复应答。Murphy等<sup>[40]</sup>利用山羊建立了骨性关节炎模型,他们切除了山羊的前交叉韧带和后交叉韧带,使关节表面迅速退化发展为骨性关节炎,随后接受自体间

充质干细胞治疗, 结果发现半月板与表面软骨得到了修复改善, 但间充质干细胞大部分附着于滑膜和半月板表面, 未向软骨大量聚集, 这与退变发生过程中间充质干细胞的表现正好相反。Horie 等<sup>[41]</sup>在大鼠身上进行干细胞修复试验, 发现间充质干细胞改变本身的细胞信号传导途径, 类似甲状旁腺激素的物质释放增多, 上调了 BMP-2 的表达和 ihh 信号, 促进 2 型胶原蛋白释放增加, 进一步印证了间充质干细胞可能是通过旁分泌调节修复软骨损伤。

## 7 结语

骨性关节炎给中老年人及社会带来巨大负担, 目前的治疗方法如疼痛管理、人工关节置换术不足以满足各种需求, 间充质干细胞提供了一种新的治疗途径。这种治疗方法目前仍有争议, 需要更多的临床试验研究, 尤其控制间充质干细胞分化的各种潜在分子机制、理想的细胞来源、更加优化的导入途径等。随着交叉学科的开展与成熟, 我们有理由相信间充质干细胞能够为骨性关节炎的患者提供更多的选择和帮助。

## 参考文献

- 1 Cucchiaroni M, de Girolamo L, Filardo G, et al. Basic science of osteoarthritis [J]. *J Exp Orthop*, 2016, 3 (1): 22.
- 2 Sampson S, Botto-Van Bemden A, Aufiero D. Stem cell therapies for treatment of cartilage and bone disorders: osteoarthritis, avascular necrosis, and non-union fractures [J]. *PM R*, 2015, 7 (4 Suppl): S26-S32.
- 3 Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation [J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9 (1): 204.
- 4 Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, et al. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21 (14): 2724-2752.
- 5 Afizah H, Hui JH. Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis [J]. *J Clin Orthop Trauma*, 2016, 7 (3): 177-182.
- 6 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8 (4): 315-317.
- 7 Glenn JD. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy [J]. *World Journal of Stem Cells*, 2014, 6 (5): 526.
- 8 Meirelles Lda S, Fontes AM, CovaS DT, et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2009, 20 (5-6): 419-427.
- 9 De Almeida DC, Donizetti-Oliveira C, Barbosa-Costa P, et al. In search of mechanisms associated with mesenchymal stem cell-based therapies for acute kidney injury [J]. *Clin Biochem Rev*, 2013, 34 (3): 131-144.
- 10 Krampera M, Galipeau J, Shi Y, et al. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal [J]. *Cytotherapy*, 2013, 15 (9): 1054-1061.
- 11 Kozhemyakina E, Lassar AB, Zelzer E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation [J]. *Development*, 2015, 142 (5): 817-831.
- 12 Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation [J]. *N Engl J Med*, 1994, 331 (14): 889-895.
- 13 Akgun I, Unlu MC, Erdal OA, et al. Matrix-induced autologous mesenchymal stem cell implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation in the treatment of chondral defects of the knee: a 2-year randomized study [J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2015, 135 (2): 251-263.
- 14 Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. [J]. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 1994, 76 (4): 579-592.
- 15 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.
- 16 Reyes R, Pec MK, Sánchez E, et al. Comparative, osteochondral defect repair: stem cells versus chondrocytes versus bone morphogenetic protein-2, solely or in combination [J]. *Eur Cell Mater*, 2013, 25: 351-365.
- 17 Murdoch AD, Hardingham TE, Eyre DR, et al. The development of a mature collagen network in cartilage from human bone marrow stem cells in Transwell culture [J]. *Matrix Biol*, 2016, 50: 16-26.
- 18 Nejadnik H, Hui JH, Feng Choong EP, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study [J]. *Am J Sports Med*, 2010, 38 (6): 1110-1116.
- 19 Fellows CR, Matta C, Zakany R, et al. Adipose, Bone Marrow and Synovial Joint-Derived Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair [J]. *Front Genet*, 2016, 7: 213.
- 20 Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8 (2): 166-177.
- 21 Bianchi F, Maioli M, Leonardi E, et al. A new nonenzymatic method and device to obtain a fat tissue derivative highly enriched in pericyte-like elements by mild mechanical forces from human lipoaspirates [J]. *Cell Transplant*, 2013, 22 (11): 2063-2077.
- 22 Tremolada C, Ricordi C, Caplan AI, et al. Mesenchymal Stem Cells in Lipogems, a Reverse Story: from Clinical Practice to Basic Science [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1416: 109-122.
- 23 Futami I, Ishijima M, Kaneko H, et al. Isolation and characterization of multipotent mesenchymal cells from the mouse synovium [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (9): e45517.
- 24 Ozeki N, Muneta T, Matsuta S, et al. Synovial mesenchymal stem cells promote meniscus regeneration augmented by an autologous Achilles tendon graft in a rat partial meniscus defect model [J]. *Stem Cells*, 2015, 33 (6): 1927-1938.
- 25 Kondo S, Muneta T, Nakagawa Y, et al. Transplantation of autologous synovial mesenchymal stem cells promotes meniscus regeneration in aged primates [J/OL]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jor.23211/abstract;jsessionid=0F7C51EEDA4E25C39F4A7FA1A93D2748.f03t01>.
- 26 Sekiya I, Muneta T, Horie M, et al. Arthroscopic Transplantation of Synovial Stem Cells Improves Clinical Outcomes in Knees With Cartilage Defects [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2015, 473 (7): 2316-2326.
- 27 Jones EA, Crawford A, English A, et al. Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: detection and functional evaluation at the single-cell level [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58 (6): 1731-1740.
- 28 Sordi V, Piemonti L. Therapeutic plasticity of stem cells and allograft tolerance [J]. *Cytotherapy*, 2011, 13 (6): 647-660.
- 29 Vega A, Martín-Ferrero MA, Del Canto F, et al. Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Randomized Controlled Trial [J]. *Transplantation*, 2015, 99 (8): 1681-1690.

(上接561页)

- 30 Houdek MT, Wyles CC, Martin JR, et al. Stem cell treatment for avascular necrosis of the femoral head : current perspectives [ J ] . Stem Cells Cloning, 2014, 7 : 65–70.
- 31 Bentivegna A, Miloso M, Riva G, et al. DNA Methylation Changes during In Vitro Propagation of Human Mesenchymal Stem Cells : Implications for Their Genomic Stability [ J/OL ] . <http://europepmc.org/abstract/MED/24288545>.
- 32 Nöth U, Steinert AF, Tuan RS. Technology insight : adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy [ J ] . Nat Clin Pract Rheumatol, 2008, 4 ( 7 ) : 371–380.
- 33 Emadedin M, Aghdami N, Taghiyar L, et al. Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in six patients with knee osteoarthritis [ J ] . Arch Iran Med, 2012, 15 ( 7 ) : 422–428.
- 34 Davatchi F, Abdollahi BS, Mohyeddin M, et al. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients [ J ] . Int J Rheum Dis, 2011, 14 ( 2 ) : 211–215.
- 35 Koh YG, Choi YJ. Infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis [ J ] . Knee, 2012, 19 ( 6 ) : 902–907.
- 36 Jo CH, Lee YG, Shin WH, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee : a proof-of-concept clinical trial[ J ]. Stem Cells, 2014, 32( 5 ) : 1254–1266.
- 37 Murphy JM, Dixon K, Beck S, et al. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis [ J ] . Arthritis Rheum, 2002, 46 ( 3 ) : 704–713.
- 38 Akpancar S, Tatar O, Turgut H, et al. The Current Perspectives of Stem Cell Therapy in Orthopedic Surgery [ J ] . Arch Trauma Res, 2016, 5 ( 4 ) : e37976.
- 39 Barry F, Murphy M. Mesenchymal stem cells in joint disease and repair [ J ] . Nat Rev Rheumatol, 2013, 9 ( 10 ) : 584–594.
- 40 Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, et al. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis[ J ]. Arthritis Rheum, 2003, 48( 12 ) : 3464–3474.
- 41 Horie M, Choi H, Lee RH, et al. Intra-articular injection of human mesenchymal stem cells ( MSCs ) promote rat meniscal regeneration by being activated to express Indian hedgehog that enhances expression of type II collagen [ J ] . Osteoarthritis Cartil, 2012, 20 ( 10 ) : 1197–1207.