

骨 科 学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002180

早期关节腔注射 BMSC 对创伤性关节炎的影响

钟云斌, 郑陈煌, 何金深, 吴 松

(中南大学湘雅三医院骨科, 长沙 410000)

【摘要】目的:探究骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)早期关节腔注射通过免疫调节对创伤性膝关节炎的抑制及远期保护作用。**方法:**将 48 只新西兰大白兔随机分为 BMSCs 治疗组和对照组, 采用 Hulth 法造模, 治疗组于造模后第 1 天、第 3 天、第 5 天注射 BMSC, 对照组则注射等量的磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)。分别于第 3 周和第 12 周进行膝关节 X 线检查, 取膝关节标本进行大体观察, 番红-固绿染色后行组织学观察, 取滑膜组织进行炎症因子检测。**结果:**与对照组相比, MSC 治疗组, 大体观上软骨磨损明显减少, 色泽较光亮, 骨赘形成较少; X 线显示关节间隙存在变窄, 但较对照组轻, 软骨下骨硬化不明显; 番红-固绿染色中, 细胞排列较好, 染色深, 软骨表面破坏少; 在对滑膜组织进行炎症因子检测中, 白介素(interleukin, IL)-1、IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的表达也明显降低。**结论:**BMSC 早期关节腔注射对创伤性膝关节在大体观察上有良好的改善; 在膝关节 X 线检查中, 关节间隙好于对照组; 在番红-固绿染色中, 软骨有着明显改善; 在对软骨和滑膜组织进行炎症因子检测中, 炎症因子的表达也明显降低。

【关键词】骨髓间充质干细胞; 免疫调节; 创伤性膝关节炎; 早期关节腔注射

【中图分类号】R684.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-01-07

Effects of early intra-articular injection of bone marrow mesenchymal stem cells on traumatic osteoarthritis

Zhong Yunbin, Zheng Chenhuang, He Jinshen, Wu Song

(Department of Orthopaedics, The Third Xiangya Hospital of Central South University)

【Abstract】Objective: To investigate the inhibitory and long-term protective effects of early intra-articular injection of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on traumatic knee osteoarthritis through immune regulation. **Methods:** Forty-eight New Zealand white rabbits were randomly divided into BMSCs treatment group and control group. An experimental model was established using the Hulth's method, whereby the treatment group was injected with BMSCs on the 1st, 3rd, and 5th days after the model establishment, while the control group was injected with an equivalent amount of phosphate-buffered saline. Knee X-ray was performed at the 3rd and 12th weeks. Knee specimens were collected for general observation, followed by safranin-fast green staining for histological observation, and the synovial tissues were taken for inflammatory factor examination. **Results:** Compared with the control group, the BMSC treatment group had significantly reduced cartilage wear and a clearer appearance, as well as fewer osteophytes in general observation. The X-ray showed that the joint space became narrow, but milder than that of the control group, and subchondral sclerosis was not obvious. The safranin-fast green staining exhibited a regular cell arrangement, deeper staining, and less damage on the cartilage surface. In addition, the expression of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in synovial tissues was also significantly decreased compared with the control group in the examination of inflammatory factors. **Conclusion:** Early intra-articular injection of BMSCs leads to a good improvement in the general observation of traumatic knee osteoarthritis, as well as better joint space and cartilage on X-ray and safranin-fast green staining, respectively; meanwhile, the expression of inflammatory factors is also significantly reduced in synovial tissues.

作者介绍: 钟云斌, Email: 724810224@qq.com,

研究方向: 骨关节炎的研究与治疗。

通信作者: 吴 松, Email: SWHn9058@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81572150)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190527.1451.004.html>

(2019-05-28)

【Key words】 bone marrow mesenchymal stem cell; immune regulation; traumatic knee osteoarthritis; early intra-articular injection

创伤性关节炎通常指关节损伤之后发生的骨关节炎。这种关节损伤后可以使关节软骨、软骨下骨、关节囊及关节周围的肌肉、神经受累,改变正常的生物力学,从而导致关节功能障碍。在美国,25 岁以上的成人中大约有 2 700 万骨关节炎患者,而创伤性骨关节炎大约占 12%^[1]。创伤性关节炎可以发生在任何关节,但以膝关节创伤性关节炎发生率最高,踝关节次之。与传统骨关节炎不同之处还在于发病人群,创伤性关节炎多见于爱运动的青年人、运动员、军人等。Palmieri-Smith 等^[2]发现,运动员关节创伤之后会面临在 40 岁之前发生创伤性关节炎的高风险,这样会严重降低生活质量。Rivera 等^[3]研究发现,军人在战场上关节受损伤后,发展成骨关节炎的概率达 60%,而其中膝关节损伤后发展成骨关节炎的概率最高达 100%。

目前认为创伤性膝关节炎的致病过程可以分为与机械因素相关的急性期、高水平炎症的急性创伤后期和慢性期。在急性期(数秒内)会发生细胞坏死、胶原蛋白破裂、糖胺聚糖损失及血肿形成;在急性创伤后期(在数月内)会发生细胞凋亡、白细胞浸润、炎症介质释放、细胞外基质降解、润滑剂减少和关节纤维化;在慢性期会发生关节组织重塑^[4]。在创伤性骨关节炎致病过程中,炎症因子网络发挥着重要作用。白介素(interleukin, IL)-1 家族细胞因子是急性创伤后炎症反应中的主要炎症介质,机械性关节损伤后 IL-1 表达增加,并与软骨损伤的严重程度相关^[5]。IL-1 可以诱导关节疼痛,并且通过诱导细胞外基质降解酶的表达和抑制细胞外基质合成促进软骨基质降解^[4]。人滑液中 IL-6 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的水平在急性关节损伤后显著增加^[6],并且相互作用加速软骨破坏。Chu 等^[7]对炎症在骨关节炎中以及关节力学手术矫正后的作用进行了长期临床结果数据的分析,认为临床的治疗方法向早期干预措施的改变,可以延缓致残性骨关节炎的发生。早期干预创伤性关节炎的方法有很多,如细胞疗法、生长因子、抗凋亡剂、自由基清除剂和抗炎剂的使用等,而其中干细胞治疗创伤性关节炎占重要地位。对于骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)治疗创伤性关节炎的研究,集中于 BMSCs 的软骨修复作用,但一些新型的研究表明,长期的增殖和分化不

是 BMSCs 主要的再生机制,而 BMSCs 调节周围环境中的炎症因子、影响生物活性因子、调节细胞因子和生长因子的水平才是治疗创伤性关节炎的主要机制^[8]。

为了探究 BMSCs 通过免疫调节功能干预创伤性关节炎早期炎症水平,从而达到延缓创伤性关节炎的进展,本研究利用新西兰大白兔建立 OA 模型,早期进行关节腔注射 BMSCs 和磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS),通过大体观察、X 线、组织学镜检、细胞因子检测等方面,比较实验组和对照组创伤性关节炎的严重程度。

1 材料和方法

1.1 材料

逆转录试剂盒(Promega 公司),qPCR 试剂盒(TOYOBO 公司),100 mm 培养皿(Corning 公司),胎牛血清(Gibco 公司),PBS(Gibco 公司),番红-固绿染色剂(Solarbio 公司)。

1.2 动物造模

取 6~8 月龄大小的健康新西兰大白兔 48 只,随机分为治疗组和对照组各 24 只,采用 Hulth 法造模(即切断前后交叉韧带、移除内侧半月板)如图 1 所示;于造模后 1、3、5 d,治疗组双侧膝关节腔内注射骨髓间充质干细胞 MSC,对照组给予等量的 PBS,分别于 3 周和 12 周处死取材。实验用的新西兰大白兔饲养于中南大学湘雅医学院实验动物中心,全程观察一般情况,不制动,实验流程遵循实验动物管理规范条例并已获得中南大学湘雅三医院伦理委员会审批,审批编号:LLSC[LA]2016-037。



图 1 造模实物图

1.3 BMSCs 的分离、鉴定、培养和注射

采用全骨髓培养法取出骨髓,经无菌操作转移到 100 mm 培养皿中,加入 10%胎牛血清培养基进行原代培养,培养基

中含有 1% 的青霉素和链霉素,每 3 d 换液一次,直至细胞长满(约 90%)培养皿。用抗兔 CD11b、CD34、CD45、CD90 抗体对细胞进行抗原分析,鉴别是否为 BMSCs^[9]。将长满细胞的培养,按 3 000 个细胞/cm² 进行铺板传代,待细胞长至培养皿的 90% 时(3~4 d),再进行传代一次,收集第 3 代间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)。将大约为 106 个 MSC,混匀于 0.1 mL 的 PBS 中,注入关节腔中,活动关节,使之充满整个关节腔。同法,对照组注射等量的 PBS。

1.4 大体观察和 X 线检查

取新西兰大白兔股骨髁面进行大体观察。处死前,先观察一般情况,然后进行双侧膝关节 X 线检查。

1.5 组织学染色

用 4% 多聚甲醛固定液对标本进行固定,甲酸脱钙液进行脱钙,经脱水后进行石蜡包埋、切片。采用番红-固绿染色,染色成功后,每张片子置于光学显微镜下,观看 3 个不同视野,进行观察。

1.6 细胞因子检查

取双侧膝关节胫骨侧的软骨及关节周围的滑膜组织,对滑膜组织中的 IL-1、IL-6 和 TNF- α 等因子进行 RT-qPCR 检测,得出 Ct 值,运用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法,计算出相对 mRNA 量。

1.7 统计学处理

应用 SPSS 19.0 软件对实验数据进行统计学分析,所有结果采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$),两样本之间比较采用配对设计资料 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

造模后,治疗组和对照组新西兰大白兔进食可,活动减少,伤口于术后 1 周愈合,期间无感染,术后 3~5 d 肿胀明显,肌力下降,1 周后情况逐渐好转,活动增加,关节开始出现不稳,主动活动度难以测量,被动活动度为 0°~130°。术后 3 周,治疗组关节稍肿,无明显畸形,被动活动度无明显改变;对照组关节明显肿胀,关节积液,存在骨性凸起,被动活动受限为 10°~110°。术后 12 周,治疗组关节中等肿胀,轻度畸形,被动活动轻度受限为 15°~115°;对照组关节明显肿胀,关节大量积液,存在大量骨性凸起,被动活动严重受限为 30°~100°。

2.2 大体观

对照组造模后 3 周,关节软骨面粗糙,暗淡,关节内缘有明显骨赘,关节软骨呈浅灰色。造模后 12 周,关节软骨面破坏明显加重,深度软骨下骨关节周围充满骨赘,可见溃疡形成,关节表面呈黄色。治疗组造模后 3 周,关节面平整较光滑,无明显破坏,关节边缘无骨赘形成。关节软骨呈浅蓝白

色,光泽明亮。造模后 12 周,关节面较粗糙,关节边缘少量骨赘形成,关节软骨呈黄白色。如图 2 所示。

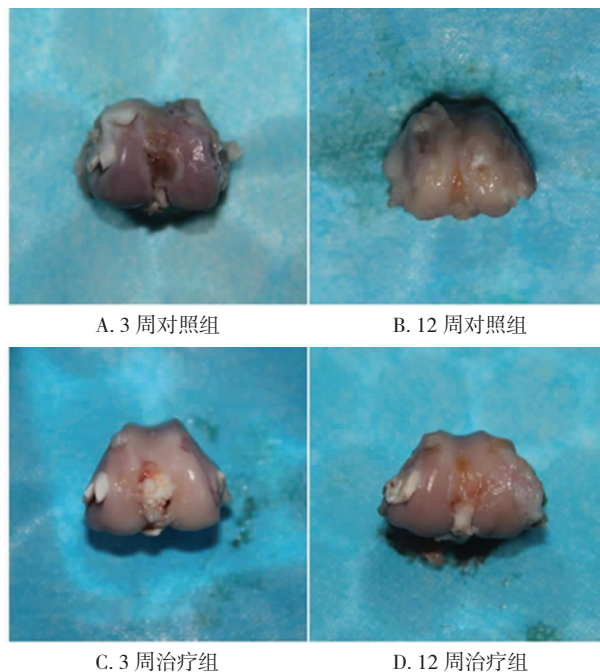


图 2 大体观

2.3 X 线

造模后 3 周,关节轻度内翻畸形,关节间隙轻度变窄,少量的骨赘增生。造模后 12 周,关节肥大及明显内翻畸形,关节间隙明显变窄,大量骨赘增生,软骨下骨硬化非常明显。治疗组造模后 3 周,关节无内翻畸形,关节间隙可疑变窄,未见骨赘增生及软骨下骨硬化。造模后 12 周,关节的内翻畸形不明显,关节间隙轻度变窄,中量的骨赘增生。如图 3 所示。

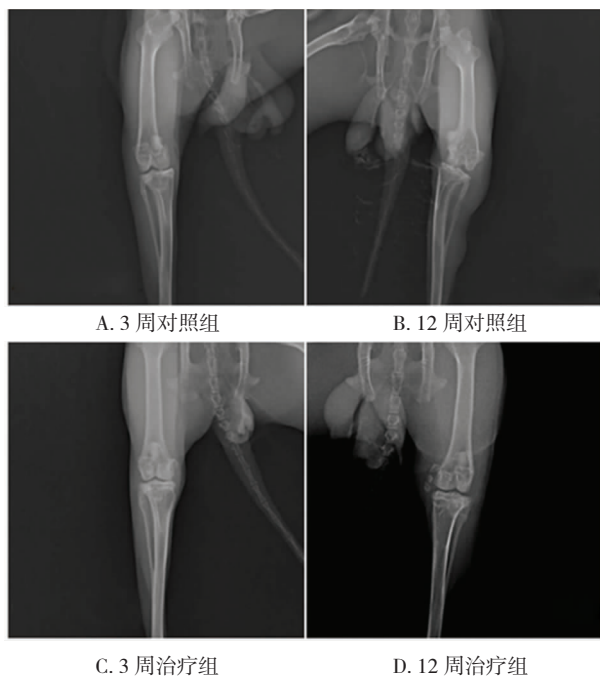


图 3 X 线

2.4 番红-固绿染色

造模后 3 周,关节软骨面较粗糙,软骨的 4 层结构尚清楚,基质着色轻度减少,潮线正常。造模后 12 周,关节软骨面破坏明显,裂隙深达钙化带,软骨的 4 层结构不清楚,基质着色明显减少,未见明显潮线。治疗组造模后 3 周,关节软骨面较平整,软骨的 4 层结构较清楚,基质着色正常,潮线正常。造模后 12 周,关节软骨面较平整,软骨的 4 层结构稍模糊,基质着色中度减少,潮线大致清楚。如图 4 所示。

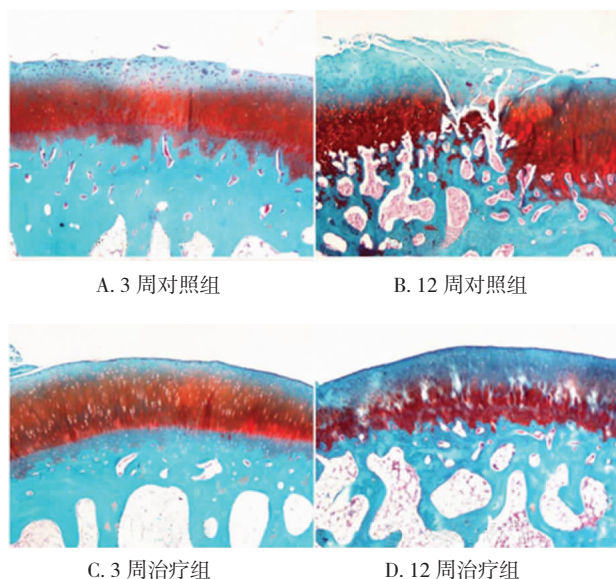


图 4 番红-固绿染色 (40×)

2.5 细胞因子检测

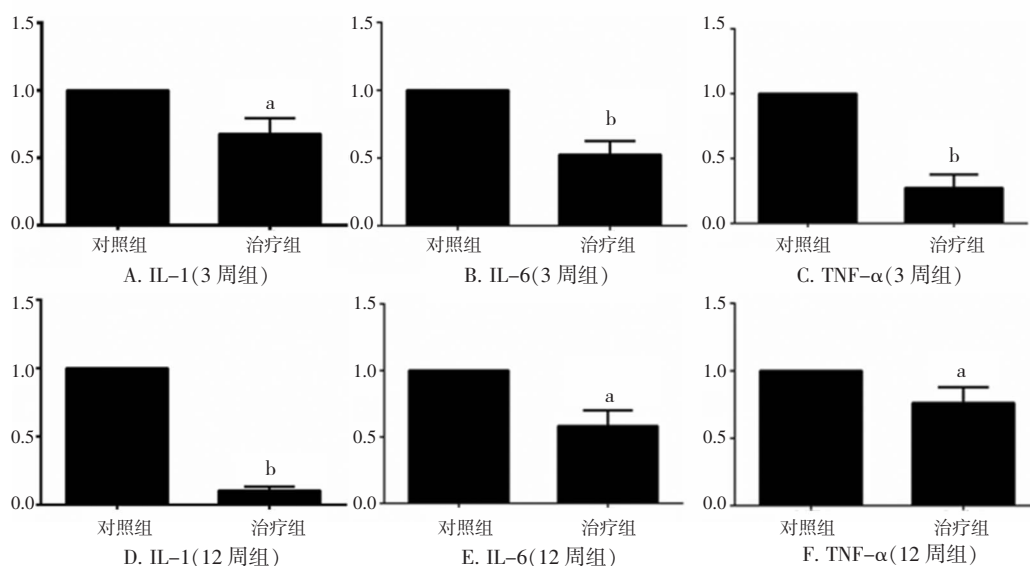
以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算得出治疗组中因子的 mRNA 相对表达量,以滑膜组织中 18S RNA 的 mRNA 水平为内参对照(即100%)。

在 3 周时,IL-1、IL-6、TNF- α 的 mRNA 水平分别为对照组的 $(66.7 \pm 32.9)\%$ 、 $(52.5 \pm 28.3)\%$ 、 $(27.3 \pm 29.1)\%$,在 12 周时,IL-1、IL-6、TNF- α 的 mRNA 水平为对照组的 $(10.4 \pm 7.7)\%$ 、 $(58.2 \pm 33.2)\%$ 、 $(76.1 \pm 32.9)\%$ 。两两比较结果显示,在造模 3 周和 12 周时,对照组滑膜中的 IL-1、IL-6、TNF- α 的 RNA 水平都高于治疗组。在配对样本 t 检验中,3 周组 IL-1($t=2.771$, $P=0.027$)、IL-6($t=4.474$, $P=0.002$)、TNF- α ($t=7.052$, $P=0.000$); 12 周组 IL-1($t=32.710$, $P=0.000$)、IL-6($t=3.552$, $P=0.009$)、TNF- α ($t=2.049$, $P=0.079$)比较,具有统计学差异,如图 5 所示。

3 讨论

本次实验表明,创伤性关节炎早期关节炎注射 BMSCs 后,造模 3 周和 12 周时,对照组滑膜中的 IL-1、TNF- α 、IL-6 RNA 水平都高于治疗组,且有统计学差异。说明 BMSCs 明显调节了创伤性关节炎的炎症因子网络。大体观、X 线检查、番红-固绿染色结果表明,治疗组的骨关节炎表现比对照组轻微,说明 BMSCs 早期关节腔注射有改善软骨破坏的作用,并能降低炎症水平,阻断炎症因子的级联放大反应,最终延缓创伤性关节炎的进展。这为临床上预防创伤性关节炎提供新的思路。

目前对于创伤性关节炎的治疗理念已经从临床治疗转移到预防创伤性关节炎的发展,而关节创伤之后发生的炎症对于创伤性关节炎的发展起着重要作用^[7]。在创伤性关节炎早期,由创伤导致的急



注:a, $P < 0.05$; b, $P < 0.01$

图 5 细胞因子 RT-qPCR 检测结果

性滑膜炎上调关节滑液中炎症因子的表达^[10]。在胫骨平台骨折小鼠模型中,早期滑膜中 IL-1 α 明显增加,且在第一天达到最高,炎症因子如 IL-1 被上调与关节损伤相关,并通过抑制基质合成和分解诱导基质金属蛋白酶活性从而导致软骨降解^[11]。Rai 等^[12]对创伤性关节新的治疗靶点研究中,认为对早期关节炎炎症的干预将会是新的治疗靶点之一。

对于 BMSCs 治疗创伤性关节炎,常常是将 BMSCs 植入支架中用于软骨组织修复,或者对 BMSCs 进行包被或与一些细胞因子结合进行软骨修复^[13]。这些研究都是在软骨已经破坏之后,即创伤性关节炎的晚期进行的。MSC 存在强大的免疫调节作用,许多报告显示,MSC 可以影响免疫 T 细胞和 B 细胞的应答^[14]。外源性的干细胞可以通过减轻关节内骨折之后的炎症,从而延缓创伤性关节炎进展^[15]。本实验使用 BMSCs 在创伤性关节炎急性炎症期进行关节注射,强调对创伤性关节炎的早期预防,由注重于 BMSCs 对创伤后急性滑膜炎的免疫调节,抑制早期炎症反应,降低了 IL-1、IL-6 和 TNF- α 等炎症因子水平,使关节软骨在 3 周和 12 周时从大体观、组织学、X 线检查上都要较对照组破坏轻,达到了预防创伤性关节炎发展的目的。

综上所述,创伤性关节炎早期炎症暴发阶段进行关节腔注射 BMSCs 可以延缓创伤性关节炎的进展,并且降低造模 3 周和 12 周后的 IL-1、IL-6 和 TNF- α 水平,表明干细胞治疗是预防创伤性关节炎的非常有前景的措施。对 BMSCs 免疫调节的机制将是下一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Thomas AC, Hubbard-Turner T, Wikstrom EA, et al. Epidemiology of posttraumatic osteoarthritis[J]. J Athl Train, 2017, 52(6): 491-496.
- [2] Palmieri-Smith RM, Cameron KL, Distefano LJ, et al. The role of athletic trainers in preventing and managing posttraumatic osteoarthritis in physically active populations: a consensus statement of the athletic trainers' osteoarthritis consortium[J]. J Athl Train, 2017, 52(6): 610-623.
- [3] Rivera JC, Wenke JC, Buckwalter JA, et al. Posttraumatic osteoarthritis caused by battlefield injuries: the primary source of disability in warriors[J]. J Am Acad Orthop Surg, 2012, 20(S1): 64-69.
- [4] Lotz MK. New developments in osteoarthritis: posttraumatic osteoarthritis: pathogenesis and pharmacological treatment options[J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(3): 211.
- [5] Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, et al. The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair[J]. Clin Orthop Relat Res, 2004, 423(423): 17-26.
- [6] Elsaid KA, Fleming BC, Oksendahl HL, et al. Decreased lubricin concentrations and markers of joint inflammation in the synovial fluid of patients with anterior cruciate ligament injury[J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(6): 1707-1715.
- [7] Chu CR, Millis MB, Olson SA. Osteoarthritis: from palliation to prevention: AOA critical issues[J]. J Bone Joint Surg Am, 2014, 96(15): e130.
- [8] Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views[J]. Stem Cells (Miami), 2007, 25(11): 2896-2902.
- [9] Xia H, Liang C, Luo P, et al. Pericellular collagen I coating for enhanced homing and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in direct intra-articular injection[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 174.
- [10] Smith MM, Cake MA, Ghosh P, et al. Significant synovial pathology in a meniscectomy model of osteoarthritis: modification by intra-articular hyaluronan therapy[J]. Rheumatology, 2008, 47(8): 1172-1178.
- [11] Lewis JS, Furman BD, Zeitler E, et al. Genetic and cellular evidence of decreased inflammation associated with reduced post-traumatic arthritis in MRL/MpJ mice[J]. Arthritis Rheum, 2013, 65(3): 660-670.
- [12] Rai MF, Duan X, Quirk JD, et al. Post-traumatic osteoarthritis in mice following mechanical injury to the synovial joint[J]. Sci Rep, 2017, 7: 45223.
- [13] Tang QO, Carasco CF, Gamie Z, et al. Preclinical and clinical data for the use of mesenchymal stem cells in articular cartilage tissue engineering[J]. Expert Opin Biol Therapy, 2012, 12(10): 1361-1382.
- [14] Corcione A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions[J]. Blood, 2006, 107(1): 367-372.
- [15] Diekmann BO, Wu CL, Louer CR, et al. Intra-articular delivery of purified mesenchymal stem cells from C57BL/6 or MRL/MpJ super-healer mice prevents post-traumatic arthritis[J]. Cell Transplant, 2013, 22(8): 1395-1408.

(责任编辑:唐秋姗)