

# 骨髓间充质干细胞关节腔内注射对膝骨性关节炎炎症因子表达的影响

姚金龙 吴睿哲 梁晓辉 孙绍裘 冯海波

作者单位: 410208 湖南长沙, 湖南中医药大学(姚金龙、吴睿哲)

410000 湖南长沙, 湖南中医药大学第二附属医院骨伤四科(梁晓辉、孙绍裘、冯海波)

通信作者: 梁晓辉, Email: 64455021@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2020.02.005

**【摘要】 目的** 探讨骨髓间充质干细胞(BMSCs)关节腔内注射对膝骨性关节炎(KOA)血清及滑膜组织中炎症因子〔白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )〕表达的影响。**方法** 将30只雄性新西兰白兔按随机数字表法分组,最终纳入动物数为生理盐水组8只,玻璃酸钠组9只和玻璃酸钠混合干细胞组9只。3组均通过手术切开膝关节韧带复制KOA模型,玻璃酸钠组关节腔内注射玻璃酸钠(每只0.3 mL)、玻璃酸钠混合干细胞组腔内注射玻璃酸钠和BMSCs混液(每只0.3 mL)、生理盐水组注射同体积生理盐水,每周1次,持续4周。4周后处死兔,检测3组血清及滑膜组织中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 含量。**结果** 玻璃酸钠组和玻璃酸钠混合干细胞组血清及滑膜组织中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 含量均明显低于生理盐水组,且玻璃酸钠混合干细胞组血清及滑膜组织中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 含量均明显低于玻璃酸钠组〔IL-1 $\beta$ (ng/L):血清9.886 $\pm$ 0.524比12.127 $\pm$ 0.974,滑膜组织21.657 $\pm$ 1.554比27.324 $\pm$ 1.747;TNF- $\alpha$ (ng/L):血清4.256 $\pm$ 0.478比6.578 $\pm$ 0.765,滑膜组织14.324 $\pm$ 0.556比17.175 $\pm$ 1.245〕,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。**结论** 关节腔内注射玻璃酸钠混合BMSCs可以降低血清及滑膜组织中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 含量,抑制滑膜炎症,从而促进关节软骨的修复。

**【关键词】** 膝骨性关节炎; 玻璃酸钠注射液; 骨髓间充质干细胞

**基金项目:** 湖南省教育厅科学研究项目(17C1220)

## Effect of intra-articular injection of bone marrow mesenchymal stem cells on the expression of inflammatory factors in knee osteoarthritis

Yao Jinlong, Wu Ruizhe, Liang Xiaohui, Sun Shaoqiu, Feng Haibo. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China (Yao JL, Wu RZ); Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410000, Hunan, China (Liang XH, Sun SQ, Feng HB)

Corresponding author: Liang Xiaohui, Email: 64455021@qq.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of intra-articular injection of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on expression of inflammatory factors [interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )] in serum and synovium of knee osteoarthritis (KOA). **Methods** According to random number table method, 30 male New Zealand rabbits were divided into three groups, finally included 8 rabbits in normal saline group, 9 rabbits in sodium hyaluronate group and 9 rabbits in sodium hyaluronate mixed stem cell group. The KOA model was established by surgical incision of knee joint. The sodium hyaluronate group was given intra-articular injection of 0.3 mL sodium hyaluronate, sodium hyaluronate mixed stem cell group was given intra-articular injection of 0.3 mL sodium hyaluronate and BMSCs, and normal saline group was injected with same volume of normal saline, once a week for 4 weeks. Four weeks later, the rabbits were sacrificed and IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in serum and synovium were detected. **Results** The contents of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in serum and synovium of sodium hyaluronate group and sodium hyaluronate mixed stem cell group were significantly lower than those of normal saline group, and the contents of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in serum and synovium of the sodium hyaluronate mixed stem cell group were significantly lower than those in sodium hyaluronate group [IL-1 $\beta$  (ng/L): serum 9.886 $\pm$ 0.524 vs. 12.127 $\pm$ 0.974, synovium 21.657 $\pm$ 1.554 vs. 27.324 $\pm$ 1.747, TNF- $\alpha$  (ng/L): serum 4.256 $\pm$ 0.478 vs. 6.578 $\pm$ 0.765, synovium 14.324 $\pm$ 0.556 vs. 17.175 $\pm$ 1.245], with significant differences (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Intra-articular injection of sodium hyaluronate combined with BMSCs can reduce the contents of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in serum and synovium, inhibit synovium inflammation, and promote the repair of articular cartilage.

**【Key words】** Knee osteoarthritis; Sodium hyaluronate injection; Bone marrow mesenchymal stem cells

**Fund program:** Scientific Research Project of Hunan Provincial Department of Education (17C1220)

膝骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是中老年人群中常见的慢性退行性疾病,随着社会老龄化, KOA 的发病率呈逐年上升趋势,已成为中老年人跛行甚至致残的重要原因<sup>[1]</sup>。KOA 的临床常见症状以关节软骨损害为特征,病变常累及软骨、滑膜以及关节周围软组织<sup>[2]</sup>。因此保护患者膝关节软骨,延长膝关节使用寿命,从而提高中老年患者生活质量,是当前亟需解决的课题。透明质酸是人体自身存在的物质,具有良好的生物相容性,以透明质酸为支架,混合骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)构成可利用的三维支架行关节腔内注射,在避免关节损伤的同时,可以起到抗炎及修复软骨的作用,具有其特有的优势。本研究旨在探讨 BMSCs 关节腔内注射对 KOA 炎症因子表达的影响,现报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组** 由湖南中医药大学动物实验中心购得成年健康雄性新西兰白兔 30 只,体质量 2.5~3.0 kg,编号后按随机数字表法分组,最终纳入动物数分别为生理盐水组 8 只、玻璃酸钠组 9 只、玻璃酸钠混合干细胞组 9 只。饲养 1 周,观察各组动物无明显疾患并确保健康。本实验过程中对动物的处置方法符合动物伦理学标准,并经本单位伦理批准(审批号:20200519)。

### 1.2 实验细胞及试剂

**1.2.1 自体 BMSCs 的制备** 将模型兔分别穿刺双侧股骨大转子骨髓腔,可得 4 mL 骨髓,以全血培养法培养纯化原代自体 BMSCs。待细胞长至铺满瓶底 90%时,用 0.25%胰蛋白酶消化,按 1:3 传代培养。以后各代均以此密度传代扩增。原代培养细胞记为 P0,此后顺次为 P1、P2 等。诱导液由营养培养基 F-12、20%胎牛血清、转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 15  $\mu$ g/L、胰岛素-转铁蛋白-硒 (insulin-transferrin-selenium, ITS) 10  $\mu$ L/mL、维生素 C 80 mg/L、地塞米松 50 mg/L 组成。消化、离心收集第 3 代 BMSCs,再加入诱导液和透明质酸(hyaluronic acid, HA)制成  $6 \times 10^8$ /mL 的细胞悬液。在 24 孔板中每孔接种 1 滴(每滴 10  $\mu$ L),形成微小三维细胞球团结构,不加入诱导液在培养箱静置 2~3 h 后,每孔轻轻加入适量诱导液,避免吹散细胞,置于细胞培养箱继续培养,每日更换 2/3 量培养液。培养第 14 天,取出细胞团用 0.25%胰蛋白酶消化,轻轻吹散后洗涤离心,留取沉淀的已分化细胞备用。

**1.2.2 试剂** 玻璃酸钠注射液(山东博士伦福瑞达制药有限公司,国药准字 H20067379)和生理盐水(中国大冢制药有限公司,产品批号 9J74B2)均购于湖南中医药大学第二附属医院。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 模型制备及处理** 通过手术切断兔膝关节前交叉韧带和内侧副韧带复制 KOA 模型。具体方法:采用化学纯氨基甲酸乙酯(乌拉坦)麻醉,用 0.9% 盐水将其配制成 25% 的溶液,按 1 g/kg 体质量(4 mL/kg 体质量)耳缘静脉注射。麻醉满意后,剪除右后肢膝关节周围毛发,常规消毒,髌旁内侧切口长约 3 cm,切开关节囊,将髌骨向外翻转,切断前交叉韧带和内侧副韧带,止血,缝合关节囊及皮肤,术后每日 1 次给予每只动物肌内注射 400 kU 青霉素进行抗感染治疗,共 3 d。1 周后待伤口愈合良好,开始强迫兔活动膝关节,每次 0.5 h,每日 2 次,4 周后 KOA 模型复制成功。

**1.3.2 药物干预** 术后每周经皮关节穿刺并注射药物,生理盐水组给予膝关节腔注射生理盐水(每只 0.3 mL),玻璃酸钠混合干细胞组给予膝关节腔内注射玻璃酸钠混合干细胞(每只 0.3 mL)、玻璃酸钠组给予关节腔内注射玻璃酸钠注射液(每只 0.3 mL),每周 1 次,持续 4 周;对侧肢体(左后肢)不予干预。

### 1.3.3 标本采集及处理

**1.3.3.1 血清样本** 4 周后各组白兔禁食 12 h,取颈外静脉血 8 mL,使用低温高速离心机 3 000 r/min 离心 10 min,提取血清。

**1.3.3.2 滑膜组织样本** 4 周后过量麻醉处死兔,每只依次打开关节腔用锐刀切取内侧滑膜和股骨内髁下面全层关节软骨,留取标本备检。

**1.3.4 炎症因子水平测定** 采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清及滑膜组织中白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$  和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )含量。

**1.4 统计学方法** 采用 SPSS 17.0 统计软件分析数据,符合正态分布的计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

玻璃酸钠组和玻璃酸钠混合干细胞组兔血清及滑膜组织中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平均明显低于生理盐水组;玻璃酸钠混合干细胞组血清及滑膜组织中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平均明显低于玻璃酸钠组(均  $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 不同干预方式 3 组 KOA 模型兔血清及滑膜组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  含量的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	IL-1 $\beta$ (ng/L)	
		血清	滑膜组织
生理盐水组	8	20.345 $\pm$ 1.524	42.324 $\pm$ 1.433
玻璃酸钠组	9	12.127 $\pm$ 0.974 <sup>a</sup>	27.324 $\pm$ 1.747 <sup>a</sup>
玻璃酸钠混合干细胞组	9	9.886 $\pm$ 0.524 <sup>ab</sup>	21.657 $\pm$ 1.554 <sup>ab</sup>

  

组别	动物数 (只)	TNF- $\alpha$ (ng/L)	
		血清	滑膜组织
生理盐水组	8	8.238 $\pm$ 0.478	21.324 $\pm$ 0.556
玻璃酸钠组	9	6.578 $\pm$ 0.765 <sup>a</sup>	17.175 $\pm$ 1.245 <sup>a</sup>
玻璃酸钠混合干细胞组	9	4.256 $\pm$ 0.478 <sup>ab</sup>	14.324 $\pm$ 0.556 <sup>ab</sup>

注: KOA 为膝骨性关节炎, IL-1 $\beta$  为白细胞介素-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  为肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 与生理盐水组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与玻璃酸钠组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

### 3 讨论

KOA 属于临床常见骨科疾病, 主要以关节软骨慢性退行性改变为临床病理特征, 目前其治疗关键仍为减缓软骨退变<sup>[3]</sup>。KOA 晚期手术治疗费用高, 并发症多, 手术风险大。软骨细胞的新生目前仍是骨科领域面临的难题, 软骨细胞本身迁徙能力不高, 增生能力差, 再生能力也非常低, 故软骨损伤后很难自体恢复。另外软骨细胞取材困难, 来源有限, 故体外培养困难, 因此难以成为有效的种子细胞<sup>[4]</sup>。

BMSCs 是一类来源于中胚层具有多向分化潜能的干细胞。Caplan 等<sup>[5]</sup>及 Lodi 等<sup>[6]</sup>认为 BMSCs 注射以及移植方案正在成为一种用于软骨修复的有效治疗方法, 主要由于其具有较强的分化成各种结缔组织(包括软骨、骨、脂肪、肌腱、韧带等)的能力。近年来对 BMSCs 的研究逐渐深入, BMSCs 存在于自体骨髓中, 具有取材方便、来源广泛、无免疫排斥反应并且性状稳定、易于保存等优势<sup>[7]</sup>。这促使 BMSCs 用于软骨修复变为可能。其中在动物实验中, Caplan 等<sup>[8]</sup>用适量的 BMSCs 干预兔膝关节的股骨髁全层软骨损伤模型, 发现关节软骨有不同程度的修复。Mason 等<sup>[9]</sup>利用腺病毒转染 BMP27 基因到兔 BMSCs, 促进 BMSCs 的表达, 在修复兔膝关节软骨缺损模型中有效改善软骨质量并缩短软骨修复时间。而 Yoo 等<sup>[10]</sup>分离骨髓中的 BMSCs, 体外培养导入基因, 而后将这些经过遗传修饰的细胞与软骨诱导因子一起输回体内, 发现靶细胞和生物活性因子到达受损的关节软骨处并使关节软骨逐渐恢复功能。张钟元等<sup>[11]</sup>也发现关节镜清理联合自体 BMSCs 移植能有效促进早期 KOA 关节软骨的修复, 延缓 KOA 病程的进展。

促炎细胞因子也称前炎性细胞因子, 具有较强

的生物学效应, 主要由免疫细胞生成, 可介导多种免疫反应。而膝关节内促炎细胞因子与抗炎细胞因子保持动态平衡, 共同维持关节软骨的生理代谢。目前发现的 KOA 促炎细胞因子主要包括 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-15、IL-6、IL-17 及 IL-18 等。其中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  在 KOA 发病进程中可通过丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、核转录因子- $\kappa$ B(nuclear transcription factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 信号通路调控, 从而释放炎症介质, 引发关节软骨退变<sup>[12]</sup>。基于以上研究, 推断 BMSCs 保护软骨可能与其抑制促炎细胞因子有关。

本实验结果表明, BMSCs 关节腔内注射可减少 KOA 模型兔血清和滑膜组织中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的表达, 并与玻璃酸钠互为协同作用, 从而保护关节软骨, 这为临床治疗 KOA 提供了实验依据, 但其具体干预机制尚有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- Singh AK, Kalaivani M, Krishnan A, et al. Prevalence of osteoarthritis of knee among elderly persons in urban slums using American College of Rheumatology (ACR) Criteria [J]. J Clin Diagn Res, 2014, 8 (9): 9-11. DOI: 10.7860/JCDR/2014/7763.4868.
- 刘克敏, 刘晓磊. 膝关节骨性关节炎康复治疗的现状及进展 [J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012, 6 (4): 972-976. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.04.037.
- 郭洪亮, 帖小佳, 韩亚军, 等. 定向诱导骨关节炎患者骨髓间充质干细胞向软骨细胞的分化 [J]. 中国组织工程研究, 2015, 19 (6): 832-836. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344
- Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century [J]. Trends Mol Med, 2001, 7 (6): 259-264. DOI: 10.1016/s1471-4914(01)02016-0.
- Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators [J]. J Cell Biochem, 2006, 98 (5): 1076-1084. DOI: 10.1002/jcb.20886.
- Lodi D, Iannitti T, Palmieri B. Stem cells in clinical practice: applications and warnings [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30: 9. DOI: 10.1186/1756-9966-30-9.
- 江华, 肖增明. 骨髓间充质干细胞在骨科疾病修复中的应用 [J]. 中国临床康复, 2006, 10 (45): 118-120. DOI: 10.3321/j.issn:1673-8225.2006.45.049.
- Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, et al. Principles of cartilage repair and regeneration [J]. Clin Orthop Relat Res, 1997, (342): 254-269.
- Mason JM, Breitbart AS, Barcia M, et al. Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering [J]. Clin Orthop Relat Res, 2000, (379 Suppl): S171-178. DOI: 10.1097/00003086-200010001-00023.
- Yoo JU, Mandell I, Angele P, et al. Chondrogenitor cells and gene therapy [J]. Clin Orthop Relat Res, 2000, (379 Suppl): S164-170. DOI: 10.1097/00003086-200010001-00022.
- 张钟元, 江和训, 赵锦伟, 等. 关节镜清理联合自体骨髓间充质干细胞移植治疗膝关节炎疗效观察 [J]. 风湿病与关节炎, 2018, 7 (6): 39-42. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4174.2018.06.009.
- 黄庆恩, 黎金焕, 文立春, 等. 膝骨关节炎炎症性细胞因子的研究进展 [J]. 风湿病与关节炎, 2016, 5 (11): 74-76, 80.

(收稿日期: 2020-04-03)

(本文编辑: 邵文 张耘菲)