·综述·

脂肪源性干细胞治疗骨关节炎研究进展

杜辖东 王万春

摘要 脂肪源性干细胞(ADSC)具有促进软骨修复作用,成为治疗软骨缺损与关节退行性变的新方向。虽然ADSC治疗OA机制尚未完全阐明,但其促进软骨分化与再生的作用已得到肯定。目前应用ADSC治疗骨关节炎(OA)的主要方式有经关节镜检查清理关节腔后,在关节腔内注入自体臀部或腹部的ADSC,或联合富血小板血浆一同注入,对不同程度OA患者疗效不同。但是,对于ADSC的取材部位、诱导分化方法及治疗OA最佳应用方式、剂量、疗程尚无定论。该文对ADSC治疗OA研究进展作一综述。

关键词 脂肪源性干细胞;骨关节炎;关节软骨

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2019.04.005

骨关节炎(OA)是最常见的关节退行性病变,随着我国人口老龄化加剧,OA已逐步成为严重的医疗卫生问题。研究显示,中国40岁以上中老年人膝关节OA总患病率高达17.0%,其中男性12.3%,女性22.2%[1-3]。目前OA的确切发病机制暂不明确,可能与遗传、年龄、肥胖有关,但不论原发性或继发性OA,都是以关节软骨、软骨周围组织、细胞基质、软骨下骨合成与降解失衡为病理基础,主要包括以下几个方面:①软骨细胞凋亡;②细胞基质蛋白酶降解;③多种细胞因子失平衡,如转化生长因子(TGF)-β等抑制软骨细胞成熟的细胞因子被激活,或胰岛素样生长因子(IGF)等促进软骨再生与重塑的细胞因子缺失,进而导致关节软骨退变、缺失,随着疾病进展,由于关节软骨缺失和缺失软骨表面纤维化,关节软骨下骨外露,关节两端骨骼直接摩擦引发关节疼痛,摩擦刺激导致关节内产生炎症反应,继而出现关节粘连、僵硬、变形,进一步使疼痛加重,引发关节强直。

近年来,随着组织工程及再生医学的发展,越来越多的研究发现,脂肪源性干细胞(ADSC)具有促进软骨修复的作用,成为治疗软骨缺损与关节退行性变的新方向。脂肪干细胞不仅具有取材方便、对患者创伤小、分化能力好、不易凋亡等特点,而且能促进关节软骨增殖与分化。本文对ADSC治疗OA研究进展作一综述。

作者单位:410011 长沙, 中南大学湘雅二医院骨科

通信作者:王万春 E-mail: wanchun.wang@csu.edu.cn

1 ADSC来源

ADSC是从脂肪组织的血管基质成分(SVF)中经胶原酶消化离心得到的间充质干细胞(MSC),它位于脂肪组织内大血管的毛细血管和血管外膜中,在形态和分化潜能上与骨髓间充质干细胞(BMSC)有共同特点。Im[4]研究发现,与BMSC相比,ADSC具有在培养液中增殖较快、分化能力强、不易凋亡等特点,且在特定环境及组织条件诱导下,可分化成为软骨细胞、骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞、神经细胞等,理论上可用于治疗多种疾病如OA、心肌缺血、神经系统损伤等。

ADSC来源十分广泛,目前绝大多数ADSC是通过脂肪抽吸术或脂肪切除术并经过胶原酶消化、离心分离得到,1 g脂肪经分离约可得到1.0×10^6个ADSC。国外较经典的ADSC获得方法来源于匹兹堡大学ADSC中心,将抽脂术或术中切除的废弃脂肪组织通过胶原酶酶解,再通过离心器离心,弃上层脂肪细胞,用尼龙网过滤下层细胞,在特定培养基上培养、孵育,最后用磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤残留的非黏附红细胞,即可得到ADSC[5-6]。Housman等[7]研究认为,脂肪抽吸术不良事件发生率仅为0.068%,较为安全;相对于抽取骨髓获得BMSC等途径,通过脂肪组织获得ADSC较简便且创伤小,可作为组织工程ADSC的主要来源。

2 ADSC治疗OA的机制

van Pham等[8]研究表明,从脂肪抽吸术或手术切除的脂肪组织中获得的ADSC可以在特定条件下表达与软骨细胞信号通路结合的基因和基质标记

物。体外试验也证实，ADSC有软骨形成作用，提示ADSC具有CD73、CD90、CD105等细胞分化为软骨所必需的表面标记物[9]。ADSC在增殖分化时可分泌多种细胞因子如TGF-β[10]、神经生长因子(NGF)[11]、血管内皮生长因子(VEGF)[12]、肝细胞生长因子(HGF)等，这些细胞因子可促进软骨细胞分化、成软骨细胞相关基因表达、软骨细胞增殖，起到促进软骨再生与修复的作用。同时，ADSC对软骨细胞也有旁分泌作用，不仅能够调节相关T细胞增殖，降低炎症标志物，减轻炎症反应，改善临床症状，而且还能促进血管生成与组织存活[13]。目前虽然ADSC治疗OA机制尚未完全阐明，但其促进软骨分化与再生的作用已得到肯定。

3 ADSC治疗OA的应用

Schiavone-Panni等[14]对52例早期膝关节OA患者行关节镜下清理关节腔后进行自体ADSC关节腔内注射，平均随访15.3个月，通过国际膝关节协会(IKS)评分和疼痛视觉模拟评分(VAS)对患者进行评估，结果显示平均IKS评分从术前57.2分提高到近期随访83.0分($P<0.01$)，平均VAS评分从术前8.5分下降到近期随访5.1分($P<0.01$)，尤其对于术前VAS评分较高的患者疗效更明显。Lee等[15]将24例早期膝关节OA患者随机分为两组，每组各12例，实验组予以关节腔注射自体ADSC，对照组予以注射相同剂量生理盐水，随访6个月，并应用MRI检查对注射后软骨缺损变化进行评估，结果发现实验组膝关节美国西部Ontario和McMaster大学骨关节炎指数(WOMAC)评分明显提高，6个月时对照组WOMAC评分无明显变化，且实验组关节软骨缺损无明显增加，对照组关节软骨缺损面积持续扩大，两组均无不良事件发生。Stoddard等[16]研究认为，ADSC在膝关节OA中具有减轻疼痛和改善功能的作用，并可能延缓关节置换。Spasovski等[17]对9例OA患者予以定期关节腔注射自体ADSC治疗，随访18个月，发现所有患者术后膝关节协会(KSS)评分、特殊外科医院膝关节评分标准(HSS-KS)评分、VAS评分均有明显改善，MRI结果提示关节内软骨明显修复，膝关节无明显进一步退变。Elnahal等[18]选择了20例无其他系统并发症的膝关节OA患者，局麻下从下腹部取50 g的脂肪组织，经胶原酶分解，在超声引导下将ADSC注入膝关节腔内，随访6个月，20例患者膝关节WOMAC评分均有所上升，治疗期和随访期间未发现与抽脂或ADSC注射相关并发症，仅有4例患者诉膝关节注射后关节轻度疼痛，但经保守治疗后均好转。Koh等[19]将80例膝关节OA患者分为两组，每组40例，实验组予自体ADSC移植联合关节镜下膝关节清理术，对照组仅予单纯关节镜下膝关节清理术，术后随访24个月，结果发现实验组软骨覆盖率、Lysholm评分、膝关节损伤和骨关节炎评分(KOOS)、VAS评分、软骨修复组织MR观察评分(MOCART)均优于对照组。

Zhou等[20]建立大鼠膝关节OA模型，将ADSC植入其关节腔，采用免疫组化检测关节软骨中基质金属蛋白酶(MMP)-13、Ⅱ型胶原蛋白、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase)-3、聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶(PARP)、p62蛋白、自噬微管相关蛋白轻链β3抗体(LC3b)、络氨酸激酶(DDR)-2、碱性成纤维细胞生长因子受体(bFGFR)-1、Wnt等细胞因子表达水平，采用实时定量基因扩增荧光检测系统和蛋白质切迹法检测软骨细胞标志物mRNA和蛋白水平，并评估软骨细胞凋亡水平，结果发现ADSC可减轻大鼠OA症状，ADSC通过诱导自噬来减少促炎细胞因子分泌，抑制软骨细胞凋亡。Yamasaki等[21]使用由ADSC组成的人工无支架构建物，应用生物3D打印技术，以猪股骨滑车软骨缺损为模型，将打印物植入其中，分别于术后3个月及6个月行CT、MRI检查，发现植入处软骨组织学评分、显微病理评分均表现良好。Xu等[22]通过兔耳软骨缺损模型评价同种异体ADSC联合富血小板血浆治疗软骨缺损的疗效，发现同种异体ADSC联合富血小板血浆可明显加速软骨再生，且不会引起明显的免疫排斥反应。Feng等[23]研究发现，ADSC可抑制OA进展，促进软骨再生。Jacer等[24]研究发现，关节腔内注射自体ADSC，可培养出肉眼可见的新生软骨组织，且原先软骨缺损及磨损处可见自发形成的纤维软骨。多项研究[25-28]对ADSC治疗膝关节OA的机制进行了更深层次的探讨，认为ADSC可增加关节液中IGF-1水平，下调关节软骨中MMP和Ⅱ型胶原蛋白水平，同时释放细胞外小泡(EV)，ADSC通过这些机制修复关节软骨损伤。

4 结语

虽然目前人工关节置换已成为重症OA患者的唯一有效治疗手段，但对于大部分轻中度或早期OA患者，目前仅有的治疗手段并不能完全阻止关节退变进展。ADSC治疗软骨缺损与关节退行性变

是骨科领域的研究热点。ADSC不仅取材方便、对患者创伤小、分化能力好、不易凋亡，还可促进关节软骨增殖与分化，这为终止OA进一步进展，甚至逆转OA发展提供了可能。目前还存在以下问题。①ADSC的最佳取材部位。目前尚无文献或循证医学证据证实ADSC的最佳取材部位，且不同取材部位ADSC含量、活性、分化能力尚不相同，因此尚需进一步探讨。②如何调控ADSC分化，促使ADSC向软骨细胞、成软骨细胞分化，且避免无限制的分化与增长。③ADSC治疗OA最佳的应用方式、剂量、疗程等。

参 考 文 献

[1] Cushnaghan J, Dieppe P. Study of 500 patients with limb joint osteoarthritis. Ⅰ. Analysis by age, sex, and distribution of symptomatic joint sites[J]. Ann Rheum Dis, 1991, 50(1): 8-13.

[2] 帖小佳，郑如庚，赵梦，等. 中国中老年人膝关节骨关节炎患病率的Meta分析[J]. 中国组织工程研究，2018(4)：650-656.

[3] 王斌，邢丹，董圣杰，等. 中国膝骨关节炎流行病学和疾病负担的系统评价[J]. 中国循证医学杂志，2018，18(2)：134-142.

[4] Im GI. Bone marrow-derived stem/stromal cells and adipose tissue-derived stem/stromal cells: their comparative efficacies and synergistic effects[J]. J Biomed Mater Res A, 2017, 105(9): 2640-2648.

[5] Aksu AE, Rubin JP, Dudas JR, et al. Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells[J]. Ann Plast Surg, 2008, 60(3): 306-322.

[6] Schipper BM, Marra KG, Zhang W, et al. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells[J]. Ann Plast Surg, 2008, 60(5): 538-544.

[7] Housman TS, Lawrence N, Mellen BG, et al. The safety of liposuction: results of a national survey[J]. Dermatol Surg, 2002, 28(11): 971-978.

[8] van Pham P, Bui KH, Ngo DQ, et al. Activated platelet-rich plasma improves adipose-derived stem cell transplantation efficiency in injured articular cartilage[J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(4): 91.

[9] Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT)[J]. Cytotherapy, 2013, 15(6): 641-648.

[10] Kim WS, Park SH, Ahn SJ, et al. Whitening effect of adipose-derived stem cells: a critical role of TGF-beta 1[J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(4): 606-610.

[11] Kim KS, Lee HJ, An J, et al. Transplantation of human adipose tissue-derived stem cells delays clinical onset and prolongs life span in ALS mouse model[J]. Cell Transplant, 2014, 23(12): 1585-1597.

[12] Nakagami H, Maeda K, Morishita R, et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(12): 2542-2547.

[13] Bateman ME, Strong AL, Gimble JM, et al. Concise review: using fat to fight disease. A systematic review of nonhomologous adipose-derived stromal/stem cell therapies[J]. Stem Cells, 2018, 36(9): 1311-1328.

[14] Schiavone-Panni A, Vasso M, Braile A, et al. Preliminary results of autologous adipose-derived stem cells in early knee osteoarthritis: identification of a subpopulation with greater response[J]. Int Orthop, 2019, 43(1): 7-13.

[15] Lee WS, Kim HJ, Kim KI, et al. Intra-articular injection of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for the treatment of knee osteoarthritis: a phase iib, randomized, placebo-controlled clinical trial[J]. Stem Cells Transl Med, 2019, 8(6): 504-511.

[16] Stoddard DW, Sport M, Mokrytskiy K, et al. Symptomatic knee osteoarthritis treatment using adipose derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: A prospective study[J]. Clin J Sport Med, 2018, 28(3): e68.

[17] Spasovski D, Spasovski V, Bascarevic Z, et al. Intra-articular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of knee osteoarthritis[J]. J Gene Med, 2018, [Epub ahead of print].

[18] Elnahal A, Rashwan A, Gabr H, et al. Intra-articular injection of adipose derived stem cells in the treatment of knee osteoarthritis: a prospective case series study [J]. Cytotherapy, 2018, 20(5): S25.

[19] Koh YG, Kwon OR, Kim YS, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells with microfracture versus microfracture alone: 2-year follow-up of a prospective randomized trial[J]. Arthroscopy, 2016, 32(1): 97-109.

[20] Zhou J, Wang Y, Liu Y, et al. Adipose derived mesenchymal stem cells alleviated osteoarthritis and chondrocyte apoptosis through autophagy inducing[J]. J Cell Biochem, 2018, [Epub ahead of print].

[21] Yamasaki A, Kunitomi Y, Murata D, et al. Osteochondral regeneration using constructs of mesenchymal stem cells made by bio three-dimensional printing in mini-pigs[J]. J Orthop Res, 2019, 37(6): 1398-1408.

[22] Xu F, Yang Y, Yang T, et al. The use of allogenic adipose-derived stem cells in combination with platelet-rich fibrin for the treatment of cartilage defects in rabbit ear[J]. Am J

Transl Res, 2018, 10(6): 1900-1907.

[23] Feng C, Luo X, He N, et al. Efficacy and persistence of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells combined with hyaluronic acid in osteoarthritis after intra-articular injection in a sheep model[J]. Tissue Eng Part A, 2018, 24(3-4): 219-233.

[24] Jacer S, Shafaei H, Soleimani Rad J. An investigation on the regenerative effects of intra articular injection of co-cultured adipose derived stem cells with chondron for treatment of induced osteoarthritis[J]. Adv Pharm Bull, 2018, 8(2): 297-306.

[25] Wang J, Jiang X, Li CH, et al. An experimental study on human adiposed derived stem cells for treatment of osteoarthritis[J]. J Bio Tis Eng, 2018, 8(4): 482-488.

[26] Stancker TG, Vieira SS, Serra AJ, et al. Can photobiomodulation associated with implantation of mesenchymal adipose-derived stem cells attenuate the expression of MMPs and decrease degradation of type Ⅱ collagen in an experimental model of osteoarthritis?[J]. Lasers Med Sci, 2018, 33(5): 1073-1084.

[27] Tofino-Vian M, Guillén MI, Pérez Del Caz MD, et al. Extracellular vesicles from adipose-derived mesenchymal stem cells downregulate senescence features in osteoarthritic osteoblasts[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, [Epub ahead of print].

[28] Mei L, Shen B, Ling P, et al. Culture-expanded allogenic adipose tissue-derived stem cells attenuate cartilage degeneration in an experimental rat osteoarthritis model[J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0176107.

(收稿:2019-04-01)

(本文编辑:李圆圆)

(上接第 210 页)

[32] Wang B, Jin H, Shu B, et al. Chondrocytes-specific expression of osteoprotegerin modulates osteoclast formation in metaphyseal bone[J]. Sci Rep, 2015, 5: 13667.

[33] van den Bosch MH, Gleissl TA, Blom AB, et al. Wnts talking with the TGF-β superfamily: WISPers about modulation of osteoarthritis[J]. Rheumatology (Oxford), 2016, 55(9): 1536-1547.

[34] 姜旭, 吴成爱, 王莹, 等. 膝关节骨性关节炎中 WISP-1 调控机制的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(5): 537-540.

[35] Ge HX, Zou FM, Li Y, et al. JNK pathway in osteoarthritis: pathological and therapeutic aspects[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2017, 37(5): 431-436.

[36] Gu YT, Chen J, Meng ZL, et al. Research progress on osteoarthritis treatment mechanisms[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 93: 1246-1252.

[37] Zhang Y, Pizzute T, Pei M. A review of crosstalk between MAPK and Wnt signals and its impact on cartilage regeneration[J]. Cell Tissue Res, 2014, 358(3): 633-649.

[38] Sun HY, Hu KZ, Yin ZS. Inhibition of the p38-MAPK signaling pathway suppresses the apoptosis and expression of proinflammatory cytokines in human osteoarthritis chondrocytes[J]. Cytokine, 2017, 90: 135-143.

[39] Shi J, Zhang C, Yi Z, et al. Explore the variation of MMP3, JNK, p38 MAPKs, and autophagy at the early stage of osteoarthritis[J]. IUBMB Life, 2016, 68(4): 293-302.

[40] Liu Z, Cai H, Zheng X, et al. The involvement of mutual inhibition of ERK and mTOR in PLCγ1-Mediated MMP-13 expression in human osteoarthritis chondrocytes[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(8): 17857-17869.

(收稿:2019-03-01)

(本文编辑:李圆圆)