

间充质干细胞注射液对大鼠膝骨关节炎的影响

闫文鑫, 张 烨, 郭景玥, 李莹莹, 袁亚茹, 邸志权*

天津天诚新药评价有限公司, 天津 300301

摘要: 目的 研究间充质干细胞注射液(MSCsI)对手术法诱导的大鼠膝骨关节炎的治疗作用。方法 自70只大鼠中随机取8只为假手术组,其余62只动物均进行右侧膝关节单侧手术造模。术后4周,进行X光检查并进行K-L评分,选择模型成功、状态良好的模型动物40只,根据K-L评分随机分为模型组、玻璃酸钠(阳性药,每关节腔0.5 mg玻璃酸钠注射液)组和MSCsI低、中、高剂量(每关节腔 1.5×10^5 、 5.0×10^5 、 1.5×10^6 个细胞)组,每组8只。分组后次日开始,玻璃酸钠组每周1次,其余各组每2周1次,关节腔内注射给药,持续5周,假手术组与模型组给予等体积0.9%氯化钠溶液。使用X射线机检测大鼠膝关节病变;给药后记录大鼠行为学及痛阈变化;剖杀时记录关节软骨大体评分;试剂盒法检测血清中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子 β (TGF- β)、II型胶原C端肽(CTX-II)、前列腺素E₂(PGE₂)水平;取膝关节组织进行病理切片,HE染色、甲苯胺蓝染色观察组织损伤。结果 与模型组相比,MSCsI高剂量显著降低大鼠X光评分($P < 0.05$)、降低大鼠关节软骨大体观察评分($P < 0.05$);给药4周后,MSCsI低、中、高剂量显著降低大鼠行为学评分($P < 0.05$ 、 0.01),中、高剂量显著升高大鼠痛阈($P < 0.01$);MSCsI低剂量显著降低血清中IL-1 β 水平、升高TGF- β 水平($P < 0.05$),中剂量显著降低血清中IL-1 β 、IL-6、CTX-II水平、升高TGF- β 水平($P < 0.05$ 、 0.01),高剂量显著降低血清中IL-1 β 、IL-6、CTX-II、PGE₂水平、升高TGF- β 水平($P < 0.05$ 、 0.01);HE染色结果显示,MSCsI各剂量能有效减轻模型大鼠组织病理学改变,滑膜、软骨及软骨下骨病变较轻;甲苯胺蓝染色显示,MSCsI各剂量可减小模型大鼠软骨基质损伤。结论 MSCsI每2周1次关节腔内注射对手术诱导的大鼠膝骨关节炎有明显的治疗作用。

关键词: 间充质干细胞; 膝骨关节炎; X光; 行为学; 软骨; 炎症因子

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)10-2179-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.10.015

Effect of Mesenchymal Stem Cells Injection on knee osteoarthritis in rats

YAN Wenxin, ZHANG Ye, GUO Jingyue, LI Yingying, YUAN Yaru, DI Zhiquan

Tianjin Tiancheng Drug Assessment Research Co., Ltd., Tianjin 300301, China

Abstract: **Objective** To evaluate the efficacy of Mesenchymal Stem Cells Injection (MSCsI) on knee osteoarthritis induced by surgery in rats. **Methods** Eight out of 70 rats were randomly selected as the sham-operated group, while the remaining 62 animals underwent unilateral surgical modeling of the right knee joint. Four weeks after surgery, X-ray examination and K-L score were performed. Forty model animals with successful and good condition were selected and randomly divided into model group, sodium hyaluronate (positive drug, 0.5 mg sodium hyaluronate injection per joint cavity) group, and MSCsI low, medium, and high doses (1.5×10^5 , 5.0×10^5 , 1.5×10^6 per joint cavity) group based on K-L score, with eight in each group. Starting from the day after grouping, the sodium hyaluronate group was given once a week, while the other groups were given intra-articular injection once every two weeks for five weeks. The sham-operated group and model group were given an equal volume of 0.9% sodium chloride solution. The knee lesions of rats were detected by X-ray machine. The behavior and pain threshold of rats were recorded after administration. The gross observation score of articular cartilage was recorded during dissection. Serum levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), transforming growth factor- β (TGF- β), C-terminal peptide of type II collagen (CTX-II) and prostaglandin E₂ (PGE₂) were detected by kits. The knee tissue was taken for pathological section, and the tissue injury was observed by HE staining and toluidine blue staining. **Results** Compared to model group, MSCsI 1.5×10^6 cells significantly reduced the X-ray score of rats ($P < 0.05$) and the gross observation score of rat articular cartilage ($P < 0.05$). After four weeks of administration, MSCsI 1.5×10^5 , 5.0×10^5 , and 1.5×10^6 cells significantly reduced rat behavioral scores ($P < 0.05$, 0.01), 5.0×10^5 ,

收稿日期: 2023-08-05

第一作者: 闫文鑫,女,实习研究员,主要从事药物临床前有效性评价工作。E-mail: yanwenxin@tipr.com.cn

*通信作者: 邸志权,男,副研究员,主要从事药物临床前有效性评价工作。E-mail: dizq@tipr.com.cn

1.5×10^6 cells significantly increased the pain threshold in rats ($P < 0.01$). MSCs 1.5×10^5 cells significantly reduce IL-1 β in serum level, elevated TGF- β level ($P < 0.05$), 5.0×10^5 cells significantly reduce IL-1 β , IL-6, CTX-II levels in serum, elevated TGF- β level ($P < 0.05$, 0.01), 1.5×10^6 cells significantly reduce IL-1 β , IL-6, CTX-II, PGE₂ levels in serum, elevated TGF- β levels ($P < 0.05$, 0.01). The HE staining results showed that each dose of MSCsI could effectively alleviate the histopathological changes in the model rats, with mild synovial, cartilage, and subchondral bone lesions. Toluidine blue staining showed that various doses of MSCsI can reduce cartilage matrix damage in model rats. **Conclusion** Intra-articular injection of stem cells once every two weeks has a significant therapeutic effect on surgically induced knee osteoarthritis in rats.

Key words: mesenchymal stem cells; knee osteoarthritis; X-rays; ethology; cartilage; inflammatory factor

骨关节炎是最常见的退行性关节疾病,其特征是进行性关节软骨退化、软骨下骨损伤、骨赘形成、滑膜炎等,其中膝骨关节炎的发病率最高,患者关节软骨和周围组织进行性破坏,主要表现为疼痛、僵直、关节退行性病变。目前膝骨关节炎治疗药物主要为镇痛药和非类固醇抗炎药,然而这些药物仅可减轻疼痛控制症状,不能从根本上治疗膝骨关节炎^[1-3]。

动物模型是研究膝关节骨关节炎发生和发展并建立治疗新方法的主要途径。大鼠因其可及性、成本相对较低、建模时间短、存活率高等优点,被广泛用作膝骨关节炎的非临床研究。目前膝骨关节炎的模型制作方法主要包括关节内注射、自发动物模型和手术造模。其中,手术造模因其耗时短、重复性好、成功率高成为最常用的造模方法^[4]。

有文献报道^[5],在诱导的骨关节炎动物模型中,间充质干细胞(MSCs)可以预防、治疗软骨退化,改善关节疼痛。本研究采用手术法建立大鼠膝骨关节炎模型,MSCs关节腔内给药,采用较为贴合膝骨关节炎临床诊疗过程中的检查指标,结合非临床研究情况,系统全面的从动物关节骨质变化、行为学、痛阈值变化、血清因子检测、组织病理学检查等多角度评价MSCs对大鼠膝骨关节炎的治疗作用,为后续研发从根本上治疗膝骨关节炎的药物提供试验依据。

1 材料

1.1 药品和主要试剂

间充质干细胞注射液(MSCsI,天津天诚新药评价有限公司,每支装1 mL,含细胞 1.0×10^7 个,批号TC202210300925,所用脐带标本来源于产妇捐献,已经过天津天诚新药评价有限公司伦理委员会批准,批准文号为:2022103009,捐献者已签署知情同意书。采用组织块贴壁法培养人脐带MSCs,经流式细胞术鉴定细胞表型,进行成软骨、成脂诱导分化鉴定干细胞特征);玻璃酸钠注射液(生化学工业株式会社,批号4C1B10);注射用青霉素钠(商丘市

成达动物药品厂,批号20220401);大鼠白细胞介素-1 β (IL-1 β)试剂盒(批号AK04ZN6D4255)、白细胞介素-6(IL-6)试剂盒(批号AK016T229095)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)试剂盒(批号AK05L0B67207)、转化生长因子 β (TGF- β)试剂盒(批号AK034Z8B1725),均购于ImmunoWay生物技术公司;II型胶原C端肽(CTX-II)试剂盒(美国Novus Biologicals公司,批号AK25FBL05777);前列腺素E₂(PGE₂)试剂盒(R&D公司,批号P330856)。

1.2 主要仪器

ECC2201型电子天平(南京伯尼塔科学仪器有限公司);HF-100A型兽用高频X射线机[康派(江苏)医疗科技有限公司];2450型测痛仪(IITC Life Science Inc公司);RT-6100型酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);VIP-5-Jr-J2型脱水机、Glas-J2型自动封片机(日本樱花科技有限公司);Arcadia H+C型石蜡包埋机(莱卡显微系统有限公司);IVS-410型切片机(日本大和光机工业株式会社);DP71型显微摄像系统(日本奥林巴斯光学株式会社)。

1.3 实验动物

SPF级雄性Lewis大鼠70只,体质量130~170 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2021-0006。动物饲养于天津天诚新药评价有限公司动物屏障系统,实验动物使用许可证号SYXK(津滨)2021-0008,饲养环境为SPF级,温度范围20~26℃、湿度范围40%~70%、换气次数不少于每小时15次全新风、12 h/12 h明暗交替,饲养期间动物自由进食进水,动物实验严格按照天津天诚新药评价有限公司动物伦理委员会标准执行(批准文号2023031020)。

2 方法

2.1 动物模型构建

自70只大鼠中随机取8只为假手术组,其余62只动物均进行右侧膝关节单侧手术造模。大鼠麻

醉后采用仰卧位固定,备皮,碘伏消毒。在右侧膝关节内侧面作3 cm左右的纵向切口,暴露髌韧带;在髌韧带下缘使用手术刀片轻划,钝性分离,将髌韧带拨至一旁,暴露膝关节;找到内侧半月板韧带及内侧副韧带,切断内侧副韧带;使用显微镊和显微剪配合,切断内侧半月板韧带,此时内侧半月板会暴露出来,剪断内侧半月板,剪断前交叉韧带,随后清洗伤口,复位髌韧带及肌肉组织,对肌肉及皮肤进行缝合。假手术组暴露髌韧带不做后续处理即可进行缝合。手术后每日观察,im青霉素,每天给药1次,持续3 d。

2.2 动物分组及给药

术后4周,进行X光检查并进行K-L评分(评分标准见“2.3.2”项),K-L评分1分及以上视为模型成功。选择模型成功、状态良好的模型动物40只,根据K-L评分随机分为模型组、玻璃酸钠(每关节腔0.5 mg玻璃酸钠注射液)组和MSCsI低、中、高剂量(每关节腔 1.5×10^5 、 5×10^5 、 1.5×10^6 个细胞)组,每组8只。分组后次日开始,阳性药组每周1次,其余各组每2周1次,关节腔内注射给药,给药体积50 μ L,持续5周,假手术组与模型组给予等体积0.9%氯化钠溶液。

2.3 检测指标

2.3.1 一般观察 每天进行一般观察,包括行为活动、精神状态、外观体征、呼吸、分泌物、粪便性状等。

2.3.2 膝关节X光检查 给药前、给药期间每2周1次,将大鼠麻醉后以适宜体位固定患侧大腿,高频X射线机进行膝关节成像。按K-L分级系统对膝关节病变程度进行评分,评分标准见表1^[6]。

表1 K-L分级标准

Table 1 K-L classification criteria

评分	观察指标
0	无改变
1	见可疑的关节腔狭窄(JSN)和唇样增生
2	见明确的骨赘(OP)形成及可能的JSN
3	见明确的JSN、骨质硬化及可能的形态改变
4	见较大的OP、明确的JSN、严重骨质硬化、骨畸形

2.3.3 行为学检查 给药期间每2周1次,大鼠两只后脚掌涂布印泥后,置于长1 m、宽0.21 m的跑道上让其行走。根据留在跑道上左右脚掌的印迹进行评分。左右脚掌印泥颜色一致记为0分,左脚掌<25%颜色深于右脚掌记为1分;左脚掌

[25%,50%)颜色深于右脚掌记为2分;左脚掌[50%,75%)颜色深于右脚掌记为3分;左脚掌 $\geq$ 75%颜色深于右脚掌记为4分。

2.3.4 机械痛阈值测定 给药期间每2周1次,将大鼠置于测试台上,使用VonFrey测痛仪的测试探针针对大鼠患侧足底进行触觉刺激,力度由小到大逐渐增加,记录大鼠出现缩足反应时的机械痛阈值。

2.3.5 关节软骨大体观察 给药结束大鼠安乐死后剖取膝关节,观察膝关节及软骨,进行Pelletier评分,评分标准见表2^[7]。

表2 Pelletier评分标准

Table 2 Pelletier scoring criteria

评分	观察指标
0	关节面光整,色泽如常
1	关节面粗糙,有小的裂隙且色泽灰暗
2	软骨缺损深达软骨中层
3	软骨面溃疡形成,软骨缺损深达软骨深层
4	软骨剥脱,软骨下骨质裸露

2.3.6 血清生化指标检测 大鼠麻醉取全血,4 000 r min⁻¹离心10 min后取上层血清,以ELISA法测定血清中TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 、IL-6、PGE₂、CTX-II水平,具体检测步骤参考各试剂盒的说明书。

2.3.7 关节组织病理学检查 取右膝关节组织,10%中性福尔马林固定、脱钙、石蜡包埋切片、染色(HE染色、甲苯胺蓝染色)后进行组织病理学检查。

2.4 数据处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 25.0软件进行统计,方差齐做单因素方差分析,有显著差异时采用LSD检验进行两两比较;方差不齐做Kruskal-Wallis非参数检验,并进行两两比较。

3 结果

3.1 MSCsI对大鼠膝关节X光评分的影响

X光检查是目前常用的一种无创性影像学检查方法,能够检测到关节骨质变化,按K-L分级,X光评分越高,表明关节损伤越严重。如表3所示,给药前及给药后,与假手术组相比,模型组可见明显的关节腔狭窄、骨赘和骨质硬化,X光评分显著升高($P < 0.01$),表明模型成功;与模型组相比,MSCsI高剂量组关节腔狭窄、骨赘生成及骨质硬化等病变得到有效改变,显著降低大鼠X光评分($P < 0.05$)。

3.2 MSCsI对大鼠行为学评分的影响

通过比较大鼠左右两侧脚掌印泥深浅程度判

表3 MSCsI对大鼠膝关节X光评分的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)
Table 3 Effect of stem cells on X-ray score of knee joint in rats($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/细胞	X光评分		
		给药前	给药2周	给药4周
假手术	—	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
模型	—	3.0±0.0 $\Delta\Delta$	3.0±0.0 $\Delta\Delta$	3.0±0.0 $\Delta\Delta$
MSCsI	1.5×10^5	3.0±0.0 $\Delta\Delta$	2.9±0.1	2.8±0.2
	5.0×10^5	3.0±0.0 $\Delta\Delta$	2.5±0.3	2.3±0.3
	1.5×10^6	3.0±0.0 $\Delta\Delta$	2.3±0.3*	2.0±0.3*
玻璃酸钠	0.5 mg	3.0±0.0 $\Delta\Delta$	2.5±0.2	2.4±0.3

与假手术组比较: $\Delta\Delta P<0.01$;与模型组比较: * $P<0.05$

$\Delta\Delta P<0.01$ vs sham-operated group; * $P<0.05$ vs model group

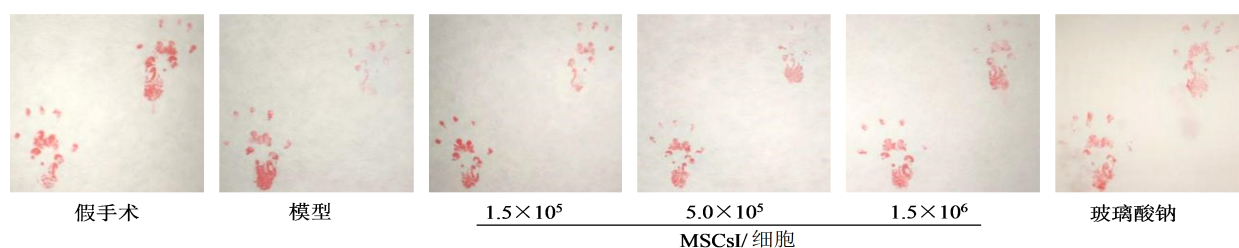


图1 干细胞对大鼠行为学的影响
Fig. 1 Effects of stem cells on behavior in rats

表4 MSCsI对大鼠行为学评分的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)
Table 4 Effect of MSCsI on behavioral scores in rats($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/细胞	行为学评分	
		给药2周	给药4周
假手术	—	0.0±0.0	0.0±0.0
模型	—	3.4±0.2 $\Delta\Delta$	3.3±0.2 $\Delta\Delta$
MSCsI	1.5×10^5	3.0±0.2	2.5±0.2*
	5.0×10^5	2.8±0.2	2.3±0.3**
	1.5×10^6	2.4±0.3*	2.1±0.2**
玻璃酸钠	0.5 mg	2.5±0.2*	2.1±0.3**

与假手术组比较: $\Delta\Delta P<0.01$;与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

$\Delta\Delta P<0.01$ vs sham-operated group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

鼠痛阈值显著升高($P<0.05$ 、 0.01), MSCsI中、高剂量组和玻璃酸钠组给药4周后大鼠痛阈值显著升高($P<0.01$)。结果见表5。

3.4 MSCsI对大鼠关节软骨大体观察评分的影响

如图2、表6所示,观察大鼠膝关节软骨损伤情况,假手术组大鼠关节面平整,色泽红润;与假手术相比,模型组大鼠关节软骨表面粗糙、失去光泽、颜色灰暗,部分关节软骨面出现缺损,有关节腔积液,根据Pelletier评分标准,关节软骨大体评分显

定大鼠走路踮脚行为。与假手术组相比,模型组大鼠行为学评分显著升高($P<0.01$);与模型组相比,给药2周后, MSCsI高剂量组、玻璃酸钠可显著降低大鼠行为学评分($P<0.05$),给药4周后, MSCsI各剂量组、玻璃酸钠组大鼠行为学评分显著降低($P<0.05$ 、 0.01)。MSCsI降低行为学评分的作用有一定的剂量相关性。结果见图1、表4。

3.3 MSCsI对大鼠机械痛阈值的影响

痛阈值是机体对外力刺激最大的承受能力,痛阈值越高,承受疼痛的能力越强。与假手术组相比,模型组痛阈值显著升高($P<0.05$ 、 0.01);与模型组相比, MSCsI高剂量组、玻璃酸钠组给药2周后大

表5 干细胞对大鼠痛阈值的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)
Table 5 Effect of MSCsI on pain threshold in rats($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/细胞	痛阈/g	
		给药2周	给药4周
假手术	—	55.3±2.3	59.2±1.7
模型	—	76.8±4.3 $\Delta\Delta$	75.1±6.8 Δ
MSCsI	1.5×10^5	79.0±6.6	79.6±5.9
	5.0×10^5	88.6±6.4	97.1±5.2**
	1.5×10^6	97.0±4.3**	97.4±5.3**
玻璃酸钠	0.5 mg	91.8±4.8*	95.9±5.5**

与假手术组比较: $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$;与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

$\Delta P<0.01$ vs sham-operated group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

著升高($P<0.01$)。与模型组相比, MSCsI高剂量组、玻璃酸钠组软骨面光泽度、表面粗糙、裂纹等情况显著改善,大鼠关节软骨大体观察评分降低($P<0.05$)。MSCsI降低关节软骨大体观察评分的作用有一定的剂量相关性。

3.5 MSCsI对大鼠血清炎症因子及软骨代谢标志物的影响

与假手术组相比,模型组血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、CTX-II、PGE₂水平明显升高, TGF- β 水平明

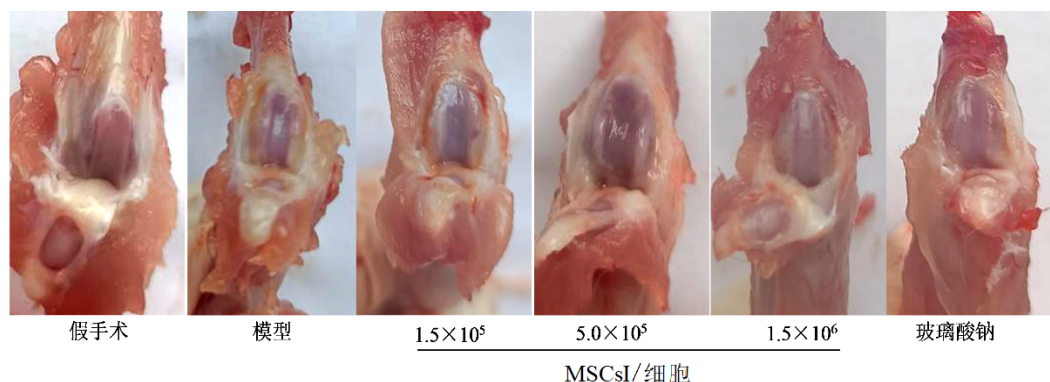


图2 MSCsI对大鼠软骨大体观察的影响

Fig. 2 Effects of MSCsI on behavior in rats

表6 MSCsI对大鼠软骨大体评分的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)Table 6 Effect of MSCsI on gross score of cartilage in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/细胞	软骨大体观察评分
假手术	—	0.0±0.0
模型	—	2.8±0.2 ^{△△}
MSCsI	1.5×10 ⁵	2.6±0.2
	5.0×10 ⁵	2.1±0.2
	1.5×10 ⁶	1.6±0.3*
玻璃酸钠	0.5 mg	1.8±0.4*

与假手术组比较: ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs sham-operated group; * $P < 0.05$ vs model group

显降低($P < 0.01$)。与模型组相比, MSCsI 低剂量组血清中 IL-1 β 水平显著降低、TGF- β 水平显著升高($P < 0.05$); MSCsI 中剂量组血清中 IL-1 β 、IL-6、CTX-II 水平显著降低, TGF- β 水平升高($P < 0.05$ 、0.01); MSCsI 高剂量显著降低血清中 IL-1 β 、IL-6、CTX-II、PGE₂ 水平, 升高 TGF- β 水平($P < 0.05$ 、0.01); 玻璃酸钠显著降低血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、CTX-II 水平, 升高 TGF- β 水平($P < 0.05$ 、0.01)。见表7。

3.6 MSCsI对大鼠关节组织病理学的影响

3.6.1 HE染色 假手术组滑膜组织结构正常、无增生, 关节软骨表面光滑平整, 软骨层及软骨细胞、

表7 MSCsI对大鼠血清炎症因子及软骨代谢标志物的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)Table 7 Effects of MSCsI on serum inflammatory factors and metabolic markers of cartilage in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/细胞	IL-1 β / (pg·mL ⁻¹)	IL-6/ (pg·mL ⁻¹)	TNF- α / (pg·mL ⁻¹)	TGF- β / (pg·mL ⁻¹)	CTX-II/ (ng·mL ⁻¹)	PGE ₂ / (pg·mL ⁻¹)
假手术	—	18.5±3.0	40.1±1.6	27.1±2.2	106.3±6.3	213.2±11.3	366.8±26.8
模型	—	47.2±2.1 ^{△△}	96.7±5.3 ^{△△}	59.8±1.8 ^{△△}	59.8±3.1 ^{△△}	554.1±24.9 ^{△△}	667.2±75.0 ^{△△}
MSCsI	1.5×10 ⁵	31.4±4.0*	72.1±3.8	62.6±1.7	73.5±6.2*	511.3±27.8	604.6±60.2
	5.0×10 ⁵	29.7±7.4**	55.2±2.3**	57.0±2.5	75.4±4.4*	471.2±22.3*	600.8±37.3
	1.5×10 ⁶	24.2±1.8**	47.4±2.6**	54.5±3.2	83.5±4.1**	430.0±24.0**	481.6±29.2*
玻璃酸钠	0.5 mg	26.4±4.5**	46.9±3.2**	53.0±1.7*	74.8±4.0*	364.9±36.1**	580.1±49.4

与假手术组比较: ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ^{△△} $P < 0.01$ vs sham-operated group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

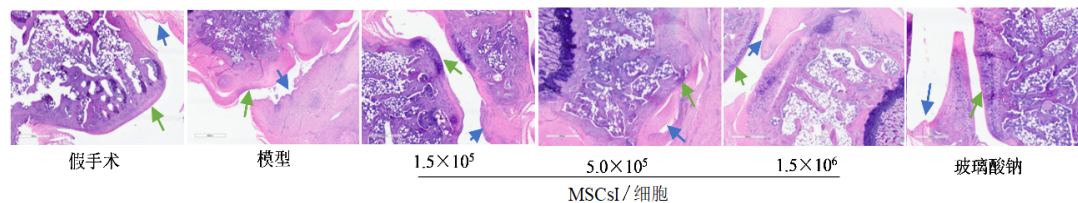
软骨下骨、骨小梁大小、排列正常, 未见明显病理改变。与假手术组相比, 模型组大鼠膝关节滑膜组织增生、炎性细胞浸润、毛细血管增多、软骨层被破坏, 软骨细胞变性/坏死, 伴纤维化变性, 软骨下骨被破坏, 骨小梁间纤维组织增多。与模型组相比, MSCsI 各剂量组与玻璃酸钠组能有效减轻组织病理学改变, 滑膜、软骨及软骨下骨病变较轻。见图3。

3.6.2 甲苯胺蓝染色 如图4所示, 假手术组软骨

基质染色均匀, 可清晰地看见软骨结构; 与假手术相比, 模型组大鼠膝关节软骨基质失染, 软骨被破坏。与模型组相比, MSCsI 各剂量组可减小软骨基质损伤。

4 讨论

关节炎是主要累及中老年人群的慢性退行性关节疾病, 以进行性的关节软骨退变、滑膜炎、软骨下骨改变和骨赘形成为特征, 常引发患者关节疼痛、僵直、功能障碍。目前临床药物对关节炎仅有

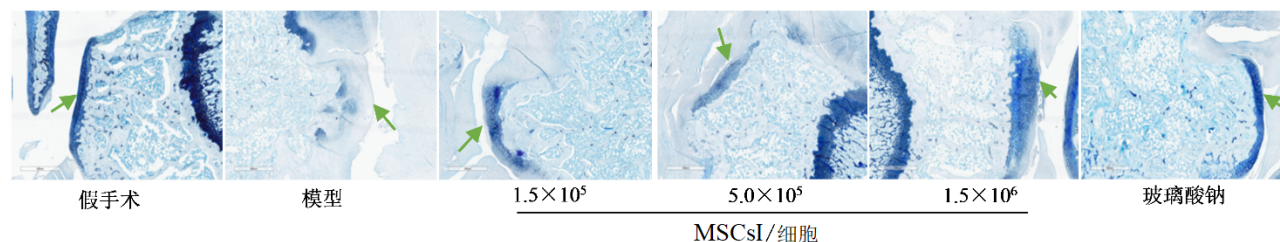


绿色箭头为软骨位置;蓝色箭头为滑膜位置

Green arrow shows cartilage; blue arrow shows synovial membrane

图3 MSCsI对大鼠关节组织病理学变化的影响(HE染色, ×40)

Fig. 3 Effect of MSCsI on joint histopathological changes in rats (HE staining, ×40)



绿色箭头为软骨位置

Green arrow shows cartilage

图4 MSCsI对大鼠关节组织病理学变化的影响(甲苯胺蓝染色, ×40)

Fig. 4 Effect of MSCsI on joint histopathological changes in rats (TBS staining, ×40)

缓解症状的作用,无法根治关节损伤。本研究采用手术诱发法建立大鼠膝骨关节炎模型, MSCsI 治疗给药,以X光检查、行为学评分、痛阈测定、血清指标检测、关节组织病理学检查为评价指标,观察 MSCsI 对大鼠手术诱发的膝骨关节炎的影响。

在正常情况下,软骨细胞调节细胞外基质成分的合成与降解使其保持平衡,然而,在病理状态下,体内平衡无法维持,细胞外基质降解增加,关节软骨被破坏。前期研究表明^[8],干细胞是一种可以使软骨细胞再生的有效方法,其可以通过平衡软骨细胞外基质的合成和降解以促进软骨细胞增殖,并且可以抑制关节局部炎症反应。炎症在关节炎的发病机制中起着至关重要的作用,多重因子参与了骨关节炎的病理变化过程^[9]。炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 以及基质金属蛋白酶(MMP)-13 等分解代谢因子迅速上调,加速软骨细胞凋亡和基质降解。其中促炎细胞因子 IL-1 β 是骨关节炎软骨破坏的关键介质之一,骨关节炎患者滑液、软骨下骨和软骨组织中 IL-1 β 水平升高, IL-1 β 可以上调软骨基质分解代谢酶,包括 MMP 和 ADAMTS^[2]; IL-6 可增加滑膜组织炎症,加速软骨降解,影响软骨细胞正常增殖; TGF- β 属于转化生长因子,可促进软骨细胞增殖,调节其分化,促进胞外基质及 II 型胶原的合成; CTX-II 为 II 型胶原蛋白分解产物之一, II 型胶原降解后, CTX-II 浓度升高; PGE₂ 可以抑制蛋白聚糖

的合成并促进软骨基质的降解。

抑制炎症可较好地预防关节炎的发生发展,而滑膜的巨噬细胞表型与炎症密切相关。巨噬细胞可分为经典活化的 M1 巨噬细胞和不同微环境下交替活化的 M2 巨噬细胞两种极化状态。M1 巨噬细胞在脂多糖和干扰素 γ 的刺激下,分泌大量促炎细胞因子,如 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等,引发机体炎症反应,对机体正常组织造成损害。M2 巨噬细胞具有抗炎活性,主要分泌 IL-10、IL-4、TGF- β 等抗炎及转化生长因子,抑制炎症发展。文献报道^[10], MSCs 具有多向分化和自我更新的潜力,可以分化为成骨、软骨、肌肉和脂肪等细胞,在机体免疫调节、组织修复等多方面发挥重要作用。MSCs 也可作用于巨噬细胞,促进滑膜巨噬细胞从 M1 到 M2 的表型转化,抑制促炎因子的释放,减少炎性细胞浸润和关节软骨损伤,延缓骨关节炎的进展。此外, MSCs 中富含大量的生物活性物质,包括蛋白质、脂质和核酸等,在这些物质中,存在大量的 miRNA,可调节多种信号转导途径。骨髓 MSCs 分泌的外泌体可提高 miR-206 的表达,降低在骨关节炎患者软骨中高表达的 E1f3,从而促进骨关节炎中的成骨细胞增殖和分化,减缓骨关节炎的进展^[11]。来源于髌下脂肪垫 MSCs 中的外泌体可通过 miR-100-5p 抑制 mTOR 信号通路,增强自噬,抑制细胞凋亡,促进细胞外基质合成^[12]。miR-92a-3p 在正常人与骨关节炎患者中的表达有

显著差异,并且在MSCs分化为软骨细胞的过程前后均有表达,miR-92a-3p可抑制软骨细胞中WNT5A的表达,促进软骨细胞的增殖及其分泌,抑制软骨的降解,降低软骨代谢标志物的表达^[13]。本研究系统全面的从动物关节骨质变化、行为学、痛阈值变化、血清因子检测、组织病理学检查等多角度评价MSCs对大鼠膝骨关节炎的治疗作用,后续将从巨噬细胞的调节作用、miRNA等角度探讨其作用机制。

本研究结果表明,MSCsI可以改善骨关节炎大鼠关节腔间隙,减轻关节软骨破坏、减少骨赘生成,改善骨关节炎大鼠行为学变化,提高大鼠痛阈值,减轻炎症反应。组织病理学显示MSCsI可不同程度地改善骨关节炎大鼠滑膜、软骨及软骨下骨的病变。综上,MSCsI通过多层次、多途径、多靶点共同作用于大鼠骨关节炎的不同环节,显示对大鼠骨关节炎有较好的治疗作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li Z, Li Z, Huang Z Q, et al. Increased HIF-1 α in knee osteoarthritis aggravate synovial fibrosis via fibroblast-like synoviocyte pyroptosis [J/OL]. Oxid Med Cell Longev, (2019-10-10) [2023-08-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6348923/>.
- [2] He L, He T W, Xing J H, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes protect cartilage damage and relieve knee osteoarthritis pain in a rat model of osteoarthritis [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 276.
- [3] Zhang L, Li M C, Li X C, et al. Characteristics of sensory innervation in synovium of rats within different knee osteoarthritis models and the correlation between synovial fibrosis and hyperalgesia [J]. J Adv Res, 2021, 35: 141-151.
- [4] Ke C, Li H Y, Yang D, et al. Melatonin attenuates the progression of osteoarthritis in rats by inhibiting inflammation and related oxidative stress on the surface of knee cartilage [J]. Orthop Surg, 2022, 14: 2230-2237.
- [5] Adeyemi Wale J, Olayaki Luqman A. Effects of single or combined administration of salmon calcitonin and omega-3 fatty acids vs. diclofenac sodium in sodium monoiodoacetate-induced knee osteoarthritis in male Wistar rats [J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2017, 28 (6): 573-582.
- [6] Kohn M D, Sassoon A A, Fernando N D. Classifications in brief: Kellgren-lawrence classification of osteoarthritis [J]. Clin Orthop Relat Res, 2016, 474(8): 1886-1893.
- [7] 欧宝芳, 别亚男, 陈千晴, 等. 改良后Hulth法和II型胶原酶注射法建立兔膝关节炎模型的比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 29-37.
- [8] Estakhri F, Panjehshahin M R, Tanideh N, et al. Efficacy of combination therapy with apigenin and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells on knee joint osteoarthritis in a rat model [J]. Iran J Med Sci, 2021, 46: 383-394.
- [9] 张沕, 黄远, 李光第, 等. 骨关节炎细胞炎性因子及软骨代谢标志物的研究现状 [J]. 广西医学, 2019, 41(11): 1428-1431.
- [10] Zhang W, Huang Y, Li G D, et al. Research status of inflammatory factors and metabolic markers of cartilage in osteoarthritis cells [J]. Guangxi Med J, 2019, 14(11): 1428-1431.
- [11] Zhang J Y, Rong Y L, Luo C Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes prevent osteoarthritis by regulating synovial macrophage polarization [J]. Aging, 2020, 12(24): 25138-25152.
- [12] Huang Y J, Zhang X M, Zhan J D, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell - derived exosomal miR-206 promotes osteoblast proliferation and differentiation in osteoarthritis by reducing Elf3 [J]. J Cellular Molecular Medi, 2021, 25(16): 7734-7745.
- [13] Wu J Y, Kuang L, Chen C, et al. miR-100-5p-abundant exosomes derived from infrapatellar fat pad MSCs protect articular cartilage and ameliorate gait abnormalities via inhibition of mTOR in osteoarthritis [J]. Biomaterials, 2019, 206: 87-100.
- [14] Mao G P, Zhang Z J, Hu S, et al. Exosomes derived from miR-92a-3p-overexpressing human mesenchymal stem cells enhance chondrogenesis and suppress cartilage degradation via targeting WNT5A [J/OL]. Stem Cell Res Ther (2018-09-26) [2023-08-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6158854/>.

[责任编辑 兰新新]