

关节镜清理联合自体骨髓间充质干细胞移植治疗 膝骨关节炎的疗效观察

谭勇海,姜苗苗,于海勇,李佳林,苟志英

(山东省文登整骨医院,山东 文登 264400)

摘要 目的:观察关节镜清理联合自体骨髓间充质干细胞移植治疗膝骨关节炎的临床疗效。**方法:**将符合要求的 72 例膝骨关节炎患者随机分为治疗组和对照组,每组 36 例。治疗组采用关节镜清理联合自体骨髓干细胞移植治疗,对照组仅采用关节镜清理治疗。分别于治疗前和关节镜清理术后 12 个月采用磁共振成像扫描仪测定患者膝关节软骨厚度,并采用 Lequesne 骨关节炎严重程度和病情活动指数评定患者的膝关节功能。**结果:**①膝关节软骨厚度。治疗前 2 组患者膝关节软骨厚度比较,差异无统计学意义[(3.80±0.24)mm,(3.85±0.23)mm, $t=0.576,P=0.793$];关节镜清理术后 12 个月,治疗组膝关节软骨厚度增加[(4.60±0.15)mm, $t=53.748,P=0.000$],对照组膝关节软骨厚度与治疗前相比,差异无统计学意义[(3.75±0.26)mm, $t=0.712,P=0.365$];治疗组关节镜清理术后 12 个月与治疗前膝关节软骨厚度的差值大于对照组[(1.06±0.16)mm,(0.46±0.08)mm, $t=3.486,P=0.000$]。②Lequesne 指数。治疗前 2 组患者 Lequesne 指数比较,差异无统计学意义[(19.72±1.34),(19.86±1.58), $t=0.278,P=0.638$];关节镜清理术后 12 个月,2 组患者膝关节 Lequesne 指数均减小[(5.19±1.12),(8.96±1.38), $t=5.879,P=0.000$];治疗组减小更明显[(14.28±1.16),(10.42±1.08), $t=5.427,P=0.000$]。结论:关节镜清理联合自体骨髓间充质干细胞移植可明显增加膝骨关节炎患者的膝关节软骨厚度,有效改善膝关节功能,是治疗膝骨关节炎的有效方法。

关键词 骨关节炎,膝 关节镜检查 骨髓移植 间质干细胞移植 治疗,临床研究性

Therapeutic effect of arthroscopy combined with autologous bone marrow stem cell grafting on knee osteoarthritis Tan Yonghai*, Jiang Miaomiao, Yu Haiyong, Li Jialin, Qing Zhiying. * The Wendeng Osteopath Hospital, Wendeng 264400, Shandong, China

ABSTRACT Objective:To observe the therapeutic effect of arthroscopy combined with autologous bone marrow stem cell(BMSC)grafting on knee osteoarthritis(KOA). **Methods:** Seventy-two patients with KOA enrolled in the study were randomly divided into treatment group and control group,36 cases in each group. Patients in treatment group were treated with arthroscopy combined with autologous BMSC grafting, while the others in control group were treated with arthroscopy. Magnetic resonance imaging(MRI)were performed and the thickness of knee articular cartilage were measured in all patients before treatment and 12 months after arthroscopy respectively. The knee joint function was assessed by using the indices of severity and disease activity for osteoarthritis. **Results:** There was no statistical difference in the thickness of knee articular cartilage between the 2 groups before the treatment(3.80 +/- 0.24 vs 3.85 +/- 0.23 mm, $t=0.576,P=0.793$). The thickness of knee articular cartilage increased in treatment group 12 months after arthroscopy(4.60 +/- 0.15 mm, $t=53.748,P=0.000$), and there was no statistical difference in the thickness of knee articular cartilage between pre-treatment and post-treatment in control group(3.75 +/- 0.26 mm, $t=0.712,P=0.365$). The differences between pre-treatment and post-treatment of treatment group were larger than that of control group in the thickness of knee articular cartilage(1.06 +/- 0.16 vs 0.46 +/- 0.08 mm, $t=3.486,P=0.000$). There was no statistical difference in the Lequesne indices between the 2 groups before the treatment(19.72 +/- 1.34 vs 19.86 +/- 1.58, $t=0.278,P=0.638$). The Lequesne indices of the 2 groups declined 12 months after arthroscopy (5.19 +/- 1.12, $t=25.894,P=0.000$; 10.42 +/- 1.08, $t=5.427,P=0.000$), and there was a bigger decline in treatment group compared to control group(14.28 +/- 1.16 vs 8.96 +/- 1.38, $t=5.879,P=0.000$). **Conclusion:** The therapy of arthroscopy combined with autologous BMSC grafting performs well on KOA for obvious increase in the thickness of knee articular cartilage and improvement in knee joint functions.

Key words Osteoarthritis, knee; Arthroscopy; Bone marrow transplantation; Mesenchymal stem cell transplantation; Therapies, investigational

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种常见的慢性、进行性骨关节疾病,多见于中老年人^[1],其发病机制尚未完全阐明。该病目前尚无特效疗法,主要以对症治疗为主。随着干细胞技术的发展,越来越

多的研究者对干细胞技术在 KOA 治疗中的应用进行了研究,并取得了一定的成绩。2010 年 2 月至 2011 年 6 月,我院采用关节镜清理联合自体骨髓间充质干细胞(bone marrow stem cell, BMSC)移植治疗 KOA,临床疗效满意,现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料 本组 72 例,男 19 例,女 53 例。年龄 39~51 岁,中位数 41.5 岁。左膝 21 例,右膝 27 例,双膝 24 例。

1.2 诊断标准 采用美国风湿病学会修订的 KOA 诊断标准^[2]:①1 个月来大多数时间有膝关节疼痛;②X 线片示关节边缘有骨赘形成;③关节滑液检查符合 OA;④年龄 >40 岁;⑤晨僵持续时间 ≤30 min;⑥关节活动时有关摩擦音。同时满足①②或①③⑤⑥或①④⑤⑥者即可诊断为 KOA。

1.3 分级标准 采用 Kellgren-Lawrence 放射学诊断标准^[3]:0 级为没有阳性发现;I 级为(可疑)微小骨赘;II 级为有明确轻微骨赘,但没有关节间隙狭窄;III 级为中度骨赘形成和(或)关节间隙明显变窄;IV 级为重度骨赘形成、关节间隙明显变窄和(或)软骨下骨质硬化。

1.4 纳入标准 ①符合上述诊断标准;②属 Kellgren-Lawrence I 级、II 级者;③年龄 <70 岁;④同意参与本研究并签署知情同意书。

1.5 排除标准 ①合并心脏病、糖尿病或其他手术禁忌证者;②手术部位有严重皮肤缺损者;③过敏体质及对多种药物过敏者。

2 方法

2.1 分组方法 采用随机数字表将纳入研究的患者随机分为治疗组和对照组。

2.2 血小板裂解液的制备 抽取患者静脉血 400 mL,在生物安全柜中用 50 mL 无菌离心管分装。以 $1\ 048\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min(离心半径 9 cm),吸取上层血清分装于 10 mL 的无菌离心管中,在 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱过夜后保存在 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中。从 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中取出并在 $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴锅中融化 5 min,然后将融化后的血清以 $3\ 054\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 6 min(离心半径 9 cm),所获得的上清液即为血小板裂解液。在其中加入氯化钙(终浓度为 $2.86\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)和凝血酶(终浓度为 $28.56\ \text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$),混匀后在 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养 6 d。6 d 后将样本以 $3\ 054\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 6 min(离心半径 9 cm),将收集到的激活的血小板裂解液在 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存。

2.3 自体 BMSC 分离培养 在局部麻醉下以患者髂后上棘为中心消毒皮肤后,用经 30 000 IU 低分子量肝素钠预处理的注射器自髂后上棘处穿刺抽取 60 mL 骨髓。采用密度梯度离心法将有核细胞分离出来,在培养液(DMEM + 10% 血小板裂解液 + $8\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 强力霉素 + $6\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 低分子量肝素钠)中培养,2~3 d 换液 1 次。第 8 天用 0.25% 胰蛋白酶消化后进行传代培养,取第 2 代细胞分装超低温冷冻储藏备用。

2.4 治疗方法 治疗组采用关节镜清理联合自体 BMSC 移植治疗,对照组仅采用关节镜清理治疗。

2.4.1 关节镜清理 采用硬膜外阻滞麻醉,麻醉起效后,患者仰卧,常规消毒、铺无菌巾。在患侧膝关节前内、前外各作 1 个约 0.5 cm 长的切口。置入并连接好关节镜器械后,按髌上囊→髌骨周缘→髌间窝→内外侧关节间隙的顺序检查并清理增生的滑膜,同时处理合并的半月板损伤。清理完成后彻底冲洗关节腔内的滑膜及软骨碎屑,逐层缝合切口并以无菌敷料包扎。

2.4.2 自体 BMSC 移植 关节镜清理术 1 个月后进行自体 BMSC 移植。BMSC 移植术前 1 周注射激活的血小板裂解液 3 mL,移植术前 3 d 复苏冻存的第 2 代 BMSC,培养 3 d 后于移植当天用 0.25% 胰蛋白酶收集 BMSC,取 10 uL 的 BMSC,适当稀释后,使用细胞计数板对 BMSC 进行计数。剩余的含 BMSC 的胰蛋白酶液以 $2\ 340\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ (离心半径 9 cm)离心 6 min,弃上清后以 3 mL 激活的血小板裂解液重悬。患者仰卧于手术台上,常规消毒、铺无菌巾。使用 5 mL 注射器抽取膝关节积液后去除连接的注射器(保留针头),然后将装有混合均匀的 BMSC 的注射器连接在留置的针头上,缓慢注入膝关节,单膝注射量为 2 mL,含 BMSC $(20.0 \sim 30.0) \times 10^6$ 个。注射完毕后用无菌纱布按压针眼处 3~5 min,患者俯卧 30 min,期间每 5 min 活动膝关节 8~10 次。BMSC 注射 1 周后,再向关节腔内注射 3 mL 激活的血小板裂解液。

2.5 疗效评定方法

2.5.1 膝关节软骨厚度 2 组患者均分别于治疗前和关节镜清理术后 7 个月、12 个月采用西门子 1.5T 超导型磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)扫描仪进行膝关节检查。采用三维脂肪抑制快速进动成像序列(Fat-suppressed three-dimensional fast imaging sequence precession, FS-3D-FISP)和三维脂肪抑

制扰相梯度回波序列 (Fat-suppressed three-dimensional spoiled gradient echo sequence, FS-3D-SGES) 平扫, 并加用 FS-3D-SGES 序列增强扫描。矢状位 T2WI FS-3D-FISP 序列扫描参数: 重复时间 (repetition time, TR)/回波时间 (echo time, TE) = 38 ms/10 ms、层厚 1.5 mm、翻转角 40°、扫描视野 180 mm、扫描矩阵 512

×384、平均激励 1 次、扫描时间 440 s; 矢状位 T2WI FS-3D-SGES 序列扫描参数: TR/TE = 28 ms/4 176 ms、层厚 1.5 mm、扫描视野 180 mm、扫描矩阵 192 × 192、平均激励 1 次、扫描时间 489 s。检查结束后在西门子 Leonardo VD10B 工作站上测量膝关节软骨厚度 (图 1)。

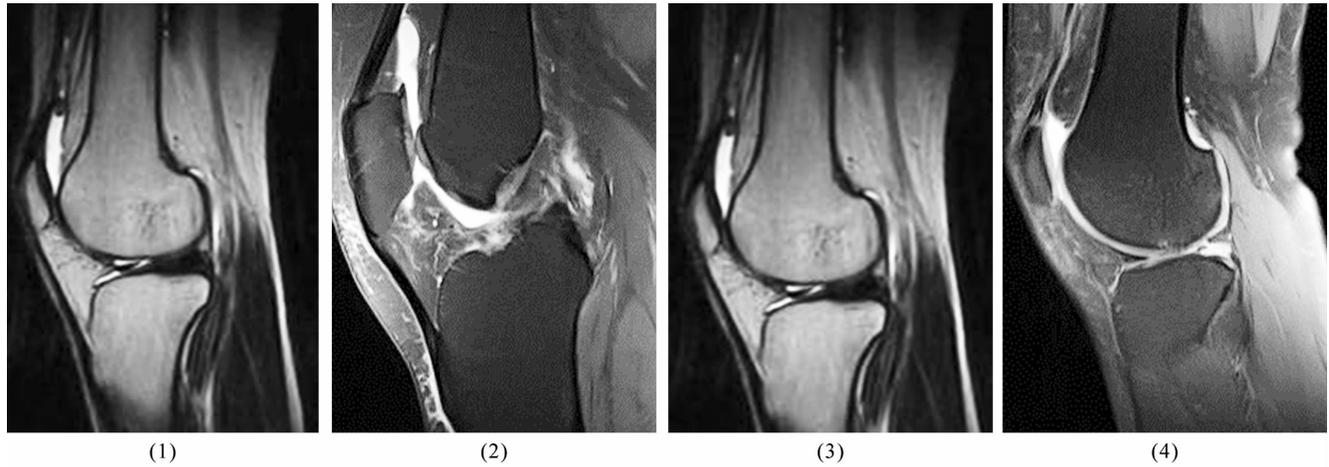


图 1 应用 MRI 测量膝关节软骨厚度

(1)(2) 治疗组关节镜清理术后 7 个月和 12 个月膝关节矢状位 T2WI MRI (3)(4) 对照组治疗前和关节镜清理术后 7 个月膝关节矢状位 T2WI MRI

2.5.2 Lequesne 指数 2 组患者均分别于治疗前和关节镜清理术后 12 个月采用 Lequesne 骨关节炎严重程度和病情活动指数^[4]评定患者的膝关节功能。

2.6 统计学方法 采用 SPSS14.0 软件对所得数据进行统计分析, 2 组患者性别、病变部位及 X 线分级的组间比较采用 χ^2 检验, 年龄、病程的组间比较采用

t 检验, 膝关节软骨厚度及 Lequesne 指数的组间比较及治疗前后的比较采用 *t* 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 分组结果 治疗组和对照组各 36 例, 2 组患者基线资料比较, 差异无统计学意义, 有可比性 (表 1)。

表 1 2 组 KOA 患者基线资料比较

组别	性别 (例)		年龄 (岁)	病程 (年)	病变部位 (例)			X 线分级 (例)		
	男	女			左膝	右膝	双膝	0 级	I 级	III 级
治疗组	10	26	53.37 ± 6.94	5.47 ± 2.14	10	14	12	11	19	6
对照组	9	27	53.76 ± 5.68	5.51 ± 1.98	11	13	12	12	18	6
检验统计量	$\chi^2 = 0.071$		<i>t</i> = 1.589	<i>t</i> = 0.384	$\chi^2 = 0.085$			$\chi^2 = 0.071$		
P 值	0.789		0.864	0.897	0.959			0.965		

3.2 疗效评定结果

3.2.1 膝关节软骨厚度 治疗前 2 组患者膝关节软骨厚度比较, 差异无统计学意义; 关节镜清理术后 12 个月, 治疗组膝关节软骨厚度增加, 对照组膝关节软骨厚度与治疗前相比, 差异无统计学意义; 治疗组关节镜清理术后 12 个月与治疗前膝关节软骨厚度的差值大于对照组 (表 2)。

月, 2 组患者膝关节 Lequesne 指数均减小, 其中治疗组减小更明显 (表 3)。

表 2 2 组 KOA 患者治疗前及关节镜清理术后 12 个月膝关节软骨厚度 mm

组别	治疗前	关节镜清理术后 12 个月	差值	<i>t</i> 值	P 值
治疗组	3.80 ± 0.24	4.60 ± 0.15	1.06 ± 0.16	53.748	0.000
对照组	3.85 ± 0.23	3.75 ± 0.26	0.46 ± 0.08	0.712	0.365
<i>t</i> 值	0.576		3.486		
P 值	0.793		0.000		

3.2.2 Lequesne 指数 治疗前 2 组患者 Lequesne 指数比较, 差异无统计学意义; 关节镜清理术后 12 个

表 3 2 组 KOA 患者治疗前及关节镜清理术后
12 个月膝关节 Lequesne 指数

组别	治疗前	关节镜清理 术后 12 个月	差值	t 值	P 值
治疗组	19.72 ± 1.34	5.19 ± 1.12	14.28 ± 1.16	25.894	0.000
对照组	19.86 ± 1.58	10.42 ± 1.08	8.96 ± 1.38	5.427	0.000
t 值	0.278		5.879		
P 值	0.638		0.000		

4 讨 论

近年来的研究表明,在生理情况下参与软骨细胞生长、成熟、分裂、老化的细胞因子包括白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factors-1, IGF-1)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 等,其中 IL-1、IL-6、TNF- α 能促进关节软骨分解; IGF-1、TGF- β 、bFGF 可促进关节软骨合成^[2,5-6]。KOA 的发生是因为上述平衡被打破,使其朝软骨分解的方向进行。我们在 BMSC 移植术前及术后注射血小板裂解液,就是为了纠正关节软骨合成与分解的失衡。

自 Friedenstin 在人类、鸟类、啮齿类等生物的骨髓中分离出 BMSC 以来,人们通过不断地研究,发现 BMSC 具有向骨、软骨、脂肪、肌肉及肌腱等组织分化的潜能^[7-10]。干细胞技术,又称为再生医疗技术,是指通过对干细胞进行分离纯化、体外培养、定向诱导、甚至基因修饰等过程,在体外培育出正常的甚至更年轻的细胞、组织或器官,并最终通过细胞、组织或器官的移植而实现对临床疾病的治疗。将 BMSC 用于临床治疗具有取材方便、无免疫排斥反应^[11]、不涉及社会伦理和法律问题等优势,在骨与软组织损伤修复方面,具有良好的应用前景^[12-13]。

我们在关节镜清理改善骨微循环障碍的基础上,将自体 BMSC 注入膝关节,为关节软骨的修复提供种子细胞。所注射的血小板裂解液中含有血管内皮细胞生长因子,可促进局部血管形成,改善局部血液供应,促进 BMSC 向软骨细胞转化。

本研究的结果显示,关节镜清理联合自体 BMSC 移植可明显增加 KOA 患者的膝关节软骨厚度,有效改善膝关节功能,是治疗 KOA 的有效方法。

5 参 考 文 献

- [1] 刘献祥,林木南,杜民,等. OA 护膝对膝骨性关节炎关节滑液细胞因子影响的实验研究[J]. 福建中医学院学报, 2006,16(6):18-21.
- [2] Hochberg MC, Altman RD, Brandt KD, et al. Guidelines for the medical management of osteoarthritis. Part II. Osteoarthritis of the knee. American College of Rheumatology[J]. Arthritis Rheum, 1995,38(11):1541-1546.
- [3] Dunn TC, Lu Y, Jin H, et al. T2 relaxation time of cartilage at Mr imaging: comparison with severity of knee osteoarthritis[J]. Radiology, 2004,232(2):592-598.
- [4] Lequesne M. Indices of severity and disease activity for osteoarthritis[J]. Semin Arthritis Rheum, 1991,20(6 Suppl 2):48-54.
- [5] 张福强,吴明霞,刘献祥,等. 福州市中老年人骨性关节炎的性别和年龄分布[J]. 福建中医学院学报, 2009,19(1):43-46.
- [6] 刘献祥,李西海,周江涛,等. 透骨消痛颗粒防治膝骨性关节炎的机理研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2007,27(1):50-54.
- [7] Ficat RP. Idiopathic bone necrosis of the femoral head. Early diagnosis and treatment[J]. J Bone Joint Surg Br, 1985,67(1):3-9.
- [8] Mont MA, Tomek IM, Hungerford DS. Core decompression for avascular necrosis of the distal femur: long term followup [J]. Clin Orthop Relat Res, 1997,(334):124-130.
- [9] Friedenstin AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers[J]. Cell Tissue Kinet, 1987,20(3):263-272.
- [10] 谭勇海,姜苗苗,韩海霞,等. 陶瓷化骨对成人骨髓基质干细胞分化的影响[J]. 中医正骨, 2012,24(5):23-26.
- [11] Johnstone B, Yoo JU. Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair [J]. Clin Orthop Relat Res, 1999,(367 Suppl):S156-162.
- [12] 郭军,林国生,鲍翠玉,等. 干细胞因子对大鼠骨髓间充质干细胞增殖与分化的影响[J]. 中国医师杂志, 2004,6(12):1601-1604.
- [13] 冯建书,胡永成,王保芝,等. 自体松质骨和骨髓间充质干细胞联合移植治疗家兔股骨头缺血性坏死的实验研究[J]. 中医正骨, 2012,24(6):13-17.