

膝关节腔注射外周血干细胞和富血小板血浆 联合口服补肾活血汤治疗膝骨关节炎

沈兴潮¹, 宋才渊², 吕帅洁³, 厉驹³, 童培建³, 夏炳江¹

(1. 绍兴市中医院, 浙江 绍兴 312000; 2. 杭州市富阳中医骨伤医院, 浙江 杭州 311400;
3. 浙江中医药大学附属第一医院, 浙江 杭州 310006)

摘要 目的:观察膝关节腔注射外周血干细胞和富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP)联合口服补肾活血汤治疗膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)的临床疗效和安全性。**方法:**2014 年 6 月至 2016 年 6 月收治 19 例 KOA 患者。男 3 例, 女 16 例; 年龄 45~67 岁, 中位数 56 岁; 均为单膝病变, 左膝 9 例、右膝 10 例; 按照 Kellgren-Lawrence 影像学分级标准, I 级 2 例、II 级 9 例、III 级 3 例、IV 级 5 例; 中医辨证均为肝肾两虚证; 病程 6~36 个月, 中位数 17 个月。抽取自体静脉血制备 PRP, 采集自体外周血干细胞悬液, 提纯后备用。第 1 周膝关节腔内注射 10 mL 外周血干细胞提纯液和 5 mL PRP, 第 2 周和第 3 周分别仅注射 5 mL PRP, 共注射 3 次。同时口服补肾活血汤, 每天 1 剂, 连续服用 1 个月。分别于治疗前及治疗开始后 1 个月、3 个月、6 个月测定患者的西安大略和麦克马斯特大学(Western Ontario and McMaster Universities, WOMAC)骨关节炎指数, 并于治疗前及治疗开始后 6 个月行膝关节 MRI 检查, 应用 CaLS 软骨评分系统进行软骨评分。观察治疗及随访过程中不良反应和并发症的发生情况。**结果:**1 例在外周血干细胞采集过程中出现抽搐, 要求停止治疗; 1 例治疗期间因外伤致腰椎骨折, 停止治疗。其余 17 例患者均完成治疗及随访观察, 随访时间 6~12 个月, 中位数 9 个月。随访过程中无不良反应和并发症发生。17 例患者治疗前及治疗开始后 1 个月、3 个月、6 个月的 WOMAC 骨关节炎指数分别为 (35.18 ± 12.67) 分、 (19.76 ± 9.29) 分、 (17.65 ± 11.26) 分、 (19.71 ± 14.90) 分; 治疗开始后 6 个月的 CaLS 软骨评分高于治疗前 $[(1.13 \pm 0.88)$ 分、 (1.43 ± 0.75) 分, $t = 2.553, P = 0.023$]。**结论:**膝关节腔注射外周血干细胞和 PRP 联合口服补肾活血汤治疗 KOA, 可有效改善患者的临床症状, 修复受损软骨, 而且具有较高的安全性。

关键词 骨关节炎; 膝; 富血小板血浆; 外周血干细胞移植; 补肾活血汤

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是临床上的常见病, 治疗方式众多, 但大多仅能在短期内缓解疼痛, 并不能延缓疾病进程。目前的研究热点为应用再生医学技术修复膝关节退变软骨, 从而延缓 KOA 退变, 主要方式有关节腔注射富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP)、干细胞、生长因子等。2014 年 6 月至 2016 年 6 月, 我们应用膝关节腔注射外周血干细胞和 PRP 联合口服补肾活血汤治疗 KOA, 现总结报告如下。

1 临床资料

本组 19 例, 均为在浙江中医药大学附属第一医院住院治疗的 KOA 患者(第一作者在浙江中医药大学攻读研究生期间收治的病例)。男 3 例, 女 16 例; 年龄 45~67 岁, 中位数 56 岁; 均为单膝病变, 左膝 9 例、右膝 10 例; 按照 Kellgren-Lawrence 影像学分级标准, I 级 2 例、II 级 9 例、III 级 3 例、IV 级 5 例; 中医

辨证均为肝肾两虚证^[1]; 病程 6~36 个月, 中位数 17 个月。纳入的病例中无妊娠或哺乳期妇女, 均不合并血液系统疾病、心血管疾病、糖尿病、免疫缺陷疾病、肿瘤、精神疾病, 膝关节局部皮肤无感染, 患侧膝关节均未接受过手术治疗。

2 方法

2.1 膝关节腔注射外周血干细胞和 PRP

2.1.1 PRP 制备 抽取 40 mL 静脉血于抗凝管内, 在室温下以 $1450 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min(离心半径: 7.5 cm), 吸取全部血浆层及白细胞层, 转移至 15 mL 离心管内, 在室温下以 $3370 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min(离心半径: 7.5 cm)。吸弃上清液, 制备 4 mL PRP 备用。处理前血小板计数 $(206.76 \pm 55.38) \times 10^9 \text{ 个} \cdot \text{L}^{-1}$, 处理后血小板计数 $(872.12 \pm 345.40) \times 10^9 \text{ 个} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.1.2 外周血干细胞采集及提纯 给患者皮下注射重组人粒细胞刺激因子注射液(杭州九源基因工程有限公司, 国药准字 S20033005), 每次 150 μg , 每天 2 次, 连续注射 3~5 d。当患者的白细胞计数 $> 25 \times$

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目(2019ZQ016)

通讯作者: 童培建 E-mail: tongpeijian@163.com

10^9 个 $\cdot L^{-1}$ 时,应用 COM. TEC 血细胞分离机(Fresenius HemoCare 公司)采集 50 mL 外周血干细胞悬浮液。

取 40 mL 干细胞悬浮液与等体积生理盐水,1:1 混合稀释,将稀释后的干细胞悬浮液等体积分装于 16 支离心管内,在每支离心管中加入 5 mL 人外周血淋巴细胞分离液,2000 $r \cdot min^{-1}$ 室温离心 20 min(离心半径:7.5 cm)。吸取干细胞层转移至另外的离心管内,1800 $r \cdot min^{-1}$ 室温离心 20 min(离心半径:7.5 cm),吸弃上清液,获得较为纯净的干细胞。将剩余 10 mL 干细胞悬浮液转移至 15 mL 离心管内,在室温下以 1500 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min(离心半径:7.5 cm),取血浆备用。取 5 mL 血浆重悬制备的较为纯净的干细胞,制备成 10 mL 外周血干细胞提纯液。制备的外周血干细胞提纯液中,单核细胞计数(43.72 ± 8.11) $\times 10^9$ 个 $\cdot L^{-1}$ 、CD34 + T 细胞计数(320.61 ± 173.33) $\times 10^9$ 个 $\cdot L^{-1}$ 。

2.1.3 注射方法 注射前在制备好的 PRP 中加入 1 mL 10% $CaCl_2$ (上海信谊金朱药业有限公司, H31021659),轻轻摇晃激活血小板^[2]。患者仰卧,膝关节伸直位,常规消毒、铺巾,以髌骨上极外侧缘为进针点。第 1 周膝关节内注射 10 mL 外周血干细胞提纯液和 5 mL PRP,第 2 周和第 3 周分别仅注射 5 mL PRP,共注射 3 次。膝关节腔注射后 48 h 内严禁剧烈活动,3 d 内进针点禁止沾水,防止感染。疼痛严重者可以口服对乙酰氨基酚类止痛药,禁止口服非甾体类

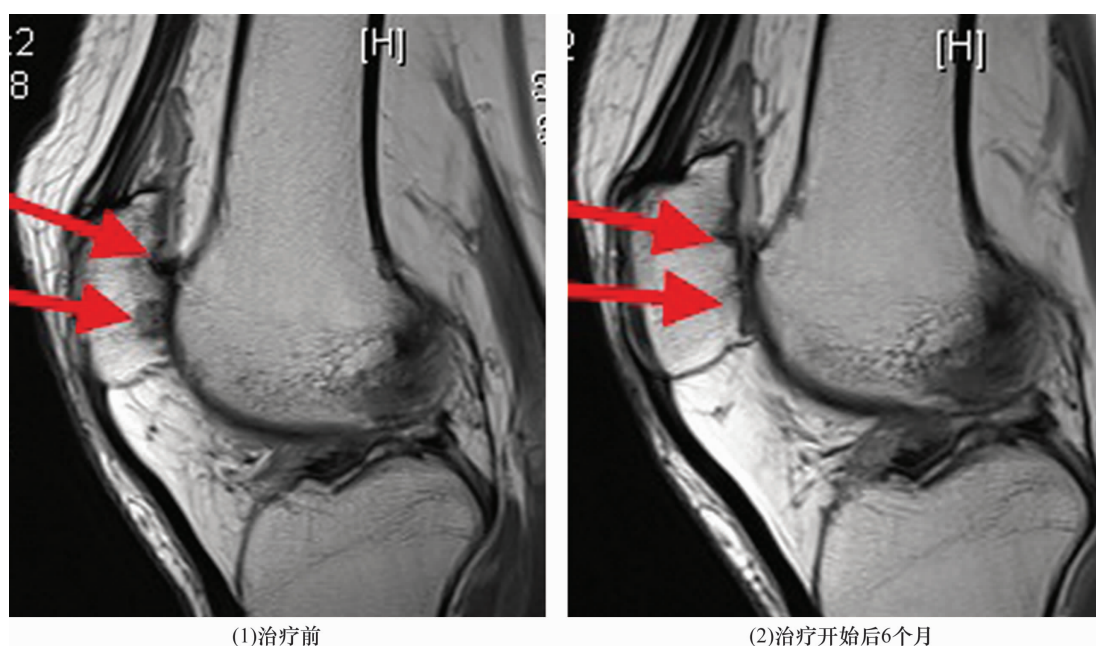
抗炎药。

2.2 口服补肾活血汤 药物组成包括熟地黄 15 g、补骨脂 15 g、菟丝子 15 g、杜仲 9 g、枸杞子 9 g、当归尾 9 g、山萸肉 9 g、肉苁蓉片 9 g、醋没药 9 g、独活 9 g、红花 6 g。每天 1 剂,水煎,分早晚 2 次服用,连续服用 1 个月。

2.3 疗效及安全性评价 分别于治疗前及治疗开始后 1 个月、3 个月、6 个月测定患者的西安大略和麦克马斯特大学(Western Ontario and McMaster Universities, WOMAC)骨关节炎指数^[3],并于治疗前及治疗开始后 6 个月行膝关节 MRI 检查,应用 CaLs 软骨评分系统^[4]进行软骨评分。观察治疗及随访过程中不良反应和并发症的发生情况。

3 结果

1 例在外周血干细胞采集过程中出现抽搐,要求停止治疗;1 例治疗期间因外伤致腰椎骨折,停止治疗。其余 17 例患者均完成治疗及随访观察,随访时间 6~12 个月,中位数 9 个月。随访过程中无不良反应和并发症发生。17 例患者治疗前及治疗开始后 1 个月、3 个月、6 个月的 WOMAC 骨关节炎指数分别为(35.18 ± 12.67)分、(19.76 ± 9.29)分、(17.65 ± 11.26)分、(19.71 ± 14.90)分;治疗开始后 6 个月的 CaLs 软骨评分高于治疗前[(1.13 ± 0.88)分, (1.43 ± 0.75)分, $t = 2.553$, $P = 0.023$]。典型病例 MRI 见图 1。



患者,女,60岁,膝骨关节炎,髌股关节退变,采用膝关节腔注射外周血干细胞和富血小板血浆联合口服补肾活血汤治疗

图1 膝骨关节炎患者治疗前后膝关节 MRI

4 讨 论

干细胞作为种子细胞,具有多向分化潜能,其治疗 KOA 可能是通过干细胞直接分化为软骨细胞修复关节软骨,或通过旁分泌作用分泌细胞因子作用于膝关节软骨细胞、滑膜细胞等,从而达到修复关节软骨的目的。Vahedi 等^[5]将髌下脂肪垫来源的干细胞与纳米纤维聚己内酯支架结合,植入绵羊膝关节软骨缺损处,发现该干细胞能直接分化为软骨细胞,并参与关节软骨修复。Sofia 等^[6]将间充质干细胞与滑膜细胞一起培养,发现间充质干细胞能明显降低滑膜细胞对基质金属蛋白酶 13 和 RELA 基因的表达,减轻关节腔内炎症反应,从而起到保护关节软骨的作用。Chahal 等^[7]应用骨髓间充质干细胞(bone marrow stem cell, BMSC)治疗 KOA,经 12 个月随访发现,该疗法能明显缓解患者的膝关节疼痛,改善膝关节功能,且能减轻关节腔内的炎症反应。Khalifeh 等^[8]应用胎盘间充质干细胞治疗 KOA,随访 24 周发现其能明显改善患者症状,且无不良反应发生。

PRP 内含多种细胞生长因子,可促进干细胞增殖、迁移、分化,并促进细胞外基质合成,PRP 激活后还能形成凝胶结构,可为干细胞附着提供支架。彭艳^[9]发现 PRP 能促进 BMSC 生长、抗凋亡,同时促进 BMSC 分泌血管内皮生长因子、血小板衍生生长因子。唐晓波等^[10]将 BMSC 在 PRP 中培养发现,PRP 能促进 BMSC 向软骨细胞分化。钟达等^[11]用不同体积分数的 PRP 培养犬的 BMSC,发现 PRP 在早期能促进 BMSC 快速增殖,且其增殖强度与 PRP 的体积分数相关。刘伟等^[12]通过扫描电镜观察发现,PRP 凝胶具有复杂的三维立体网状结构,孔隙直径为 50 ~ 100 μm ,BMSC 在 PRP 凝胶中可良好附着。Vinod 等^[13]研究发现,PRP 在促进细胞增殖、维持细胞活力、促进细胞外基质生成等方面具有协同作用,是一种有前景的生物活性支架材料。Chen 等^[14]应用羟基磷灰石、PRP 联合干细胞治疗 KOA 兔,发现联合疗法能使膝关节软骨再生。Koh 等^[15]的研究发现,PRP、间充质干细胞关节腔注射联合胫骨高位截骨术与 PRP 关节腔注射联合胫骨高位截骨术,均能改善 KOA 患者的疼痛及功能,且前者的疗效及软骨修复作用均优于后者。

KOA 属中医“痹证”范畴,肝肾亏虚为发病基础,外邪侵袭为发病诱因,致局部气滞血瘀,治以补益肝肾、填精益髓为主,佐以活血通脉,舒经活络。补肾活

血汤出自《伤科大成》,具有补肾壮筋,活血止痛的功效。相关研究发现,补肾中药具有促进 BMSC 生长、抗凋亡、分化为软骨细胞的能力。张颖等^[16]发现补肾活血药提取物能促进 BMSC 增殖,且无细胞毒性。吴刚等^[17]发现,补肾活血汤含药血清能有效促进体外培养大鼠的 BMSC 向软骨细胞分化,补肾活血汤灌胃联合 BMSC 膝关节腔内注射能有效防治 KOA 大鼠膝关节软骨破坏。

本研究的结果提示,膝关节腔注射外周血干细胞和 PRP 联合口服补肾活血汤治疗 KOA,可有效改善患者的临床症状,修复受损软骨,而且具有较高的安全性。

5 参考文献

- [1] 国家中医药管理局医政司. 22 个专业 95 个病种中医诊疗方案(合订本)[M]. 北京:中国中医药出版社,2012: 131 - 132.
- [2] PATEL S, DHILLON M S, AGGARWAL S, et al. Treatment with platelet - rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: a prospective, double - blind, randomized trial[J]. Am J Sports Med, 2013, 41(2): 356 - 364.
- [3] 蒋协远,王大伟. 骨科临床疗效评价标准[M]. 北京:人民卫生出版社,2005: 275 - 276.
- [4] ALIZAI H, VIRAYAVANICH W, JOSEPH G B, et al. Cartilage lesion score: comparison of a quantitative assessment score with established semiquantitative MR scoring systems[J]. Radiology, 2014, 271(2): 479 - 487.
- [5] VAHEDI P, JAROLMASJED S, SHAFAEI H, et al. In vivo articular cartilage regeneration through infrapatellar adipose tissue derived stem cell in nanofiber polycaprolactone scaffold[J]. Tissue Cell, 2019, 57: 49 - 56.
- [6] SOFIA V, NASRUL E, MANJAS M, et al. The influence of wharton jelly mesenchymal stem cell toward matrix metalloproteinase - 13 and RELA synovial cell gene expression on osteoarthritis[J]. Open Access Maced J Med Sci, 2019, 7(5): 701 - 706.
- [7] CHAHAL J, GÓMEZ - ARISTIZÁBAL A, SHESTOPALOFF K, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells in patients with osteoarthritis results in overall improvement in pain and symptoms and reduces synovial inflammation[J/OL]. Stem Cells Transl Med, 2019 [2019 - 01 - 16]. <https://stemcells.journals. onlinelibrary. wiley. com/doi/full/10. 1002/ sctm. 18 - 0183>.
- [8] KHALIFEH SOLTANI S, FOROGH B, AHMADBEIGI N, et al. Safety and efficacy of allogenic placental mesenchymal

- stem cells for treating knee osteoarthritis: a pilot study[J]. Cytotherapy, 2019, 21(1): 54-63.
- [9] 彭艳. 富血小板血浆激活 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路促进骨髓间充质干细胞再生及修复功能的相关研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2013.
- [10] 唐晓波, 王健, 董佩龙. 自体富血小板血浆诱导兔脂肪干细胞成软骨分化的实验研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2014, 22(11): 1025-1033.
- [11] 钟达, 廖前德, 卢吉平, 等. 不同体积分数富血小板血浆对犬骨髓间充质干细胞增殖的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(49): 9727-9730.
- [12] 刘伟, 陈剑, 宋佳, 等. 利用自体富血小板血浆构建凝胶生物细胞支架的实验研究[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(11): 1937-1940.
- [13] VINOD E, VINOD FRANCIS D, MANICKAM AMIRTHAM S, et al. Allogeneic platelet rich plasma serves as a scaffold for articular cartilage derived chondroprogenitors[J]. Tissue Cell, 2019, 56: 107-113.
- [14] CHEN Y C, HSU Y M, TAN K P, et al. Intraarticular injection for rabbit knee osteoarthritis: effectiveness among hyaluronic acid, platelet-rich plasma, and mesenchymal stem cells[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2018, 91: 138-145.
- [15] KOH Y G, KWON O R, KIM Y S, et al. Comparative outcomes of open-wedge high tibial osteotomy with platelet-rich plasma alone or in combination with mesenchymal stem cell treatment: a prospective study[J]. Arthroscopy, 2014, 30(11): 1453-1460.
- [16] 张颖, 张蕾蕾, 孙瑞波, 等. 补肾活血法对人骨髓间充质干细胞成骨能力的影响及 miR-93-5p 对其的抑制作用[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(2): 667-671.
- [17] 吴刚, 童建建. 补肾活血汤含药血清干预体外培养大鼠骨髓间充质干细胞成软骨分化及补肾活血汤联合骨髓间充质干细胞治疗大鼠膝骨关节炎的实验研究[J]. 中医正骨, 2018, 30(1): 6-11.

(收稿日期: 2019-02-16 本文编辑: 李晓乐)

· 通 知 ·

全国水针刀微创技术及中医筋骨三针法学习班通知

水针刀微创技术、中医筋骨三针疗法是由北京世针联中医微创针法研究院院长吴汉卿教授经过 30 余年潜心研究, 在传统九针、刀针、水针疗法、针挑疗法、运动针法及太极针法基础上, 根据中医经筋学说及软组织解剖学所总结的融中西医针法于一体的中医微创技术。该技术已被纳入国家中医药管理局“中医医疗适宜技术”, 写入全国高等中医药院校创新教材, 确定为中医药 I 类继续教育推广项目。该技术问世以来, 全国性培训班已成功举办 200 余期, 培训学员数万名, 学员来自国内包括台湾、香港等地区及国外, 如: 马来西亚、新加坡、韩国、俄罗斯、澳大利亚、美国等, 其“短、平、快”的治疗特点受到了国内外专家及广大学员的好评。为满足广大医师要求, 继续举办学习班, 培训内容如下。

水针刀微创技术、三氧融盘技术 ①水针刀微创技术结合三氧融盘技术治疗软组织损伤病, 如: 颈椎病、肩关节周围炎、肘关节病变、腕管综合征、腰椎间盘突出症、膝关节病变、坐骨神经痛、臀上皮神经痛、风湿类风湿关节炎、腱鞘炎、跟痛症等骨伤疼痛疾病。②水针刀尸体解剖微创入路内容: 该班在医学院解剖馆进行, 结合新鲜尸体全面讲解人体全身三维解剖以及三针法定位、进针方向、针下层次、危险区的划分、常用针法及操作技巧等内容, 学员能自己动手练习。

中医筋骨三针疗法 中医筋骨三针疗法分为微型筋骨三针疗法与巨型筋骨三针疗法 2 种, 微型筋骨三针疗法的优点: 该针具针体细如银针, 创伤微、痛苦小, 融合了中医针法和西医刀法, 定位独特, 针法灵活多变, 既有微创针刀的松解分离功能, 又有针灸的补泻候气、疏通经络功能; 该疗法主治: 中风偏瘫、失语症、三叉神经痛、面瘫、肋间神经痛、坐骨神经痛、皮神经卡压症、四肢末端病等。巨型筋骨三针疗法的优点: 该针法有钝性松解、安全可靠、通透力强、松解力度大等特点。其主要针法有: 筋膜扇形撬拨法、筋骨减压术、椎间孔针旋转术等 10 大针法; 该疗法主治: 颈腰椎术后综合征、椎管狭窄症、强直性脊柱炎驼背、颈 1 横突综合征、颈 7 棘突综合征等临床疑难病。同时培训水针刀松解埋线技术内容: 脊背九大诊疗区, 应用水针刀松解、注射、磁线留置并配合整脊手法快速治愈颈性心脏病、颈性咽炎、面瘫、癫痫、慢性支气管炎、哮喘、胃炎、胃溃疡、结肠炎、生殖疾病等; 并教授三氧自血疗法治疗心脑血管疾病, 乙肝、丙肝、脂肪肝等肝病, 妇科疾病及皮肤病性病等。

培训时间: 每月 1 日正式上课, 学期 12 天, 请提前 1 天报到。

培训方式及待遇: 学习班由吴汉卿教授主讲, 采用小班授课, 理论结合临床实习和尸体解剖操作, 学期结束后颁发培训证书及 I 类继续教育学分证书。

培训地址: ①北京班地址: 北京市东城区广渠门内夕照寺街东玖大厦 B 座 703 室, 北京世针联中医微创针法研究院。②河南南阳班地址: 河南省南阳市仲景路与天山路口, 水针刀研究院。

联系电话: 400 8377 618 **联系人:** 黄建老师 13721820657, 0377-63282507

网址: www.shuizhendao.com (中华水针刀微创网)